

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

TAMIRES GREGORIO

**EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVÍVEL
SOBRE A CICLICIDADE ESTRAL E MORFOLOGIA
OVARIANA DE RATAS COM FALHA OVARIANA
PRECOCE**

Florianópolis

2016

TAMIRES GREGORIO

**EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVÍSEL
SOBRE A CICLICIDADE ESTRAL E MORFOLOGIA
OVARIANA DE RATAS COM FALHA OVARIANA
PRECOCE**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Centro de Ciências
Biológicas, no Departamento de Ciências
Fisiológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Licenciatura em Ciências Biológicas,
tendo como orientadora a professora Dra.
Fernanda Barbosa Lima Christian.

Florianópolis

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Gilmar, que apesar de não estar entre nós sempre me apoiou nas minhas escolhas, à minha mãe Silvia e ao meu irmão Gabriel por toda a força que me dão para seguir em frente. À minha avó Alzira que é a minha inspiração, à minha avó Nena por sempre estar ao meu lado, aos meus avôs, José e Raulino, que de onde estiverem estão guiando meus passos e ao meu tio Luiz por toda ajuda e consideração que tem por mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar saúde, força e coragem para enfrentar todas as dificuldades.

A toda a minha família, por sempre acreditar e me darem suporte para seguir em frente.

À minha mãe Silvia e ao meu irmão Gabriel, que mesmo de longe sempre estiveram presentes, confiaram em mim, me deram a oportunidade de concretizar e encerrar mais um sonho na minha vida.

Ao meu pai Gilmar, que mesmo não estando aqui presente para ver a minha felicidade, sempre me mandou forças para continuar seguindo meus sonhos.

Às minhas avós, Alzira e Izolda que sempre me apoiaram apesar de todas as dificuldades.

Ao meu tio Luiz, por nunca medir esforços em me ajudar e sempre me apoiar nessa caminhada.

Aos meus tios Jânio e Maristela por me ampararem em sua casa durante o primeiro ano de faculdade e depois sempre me receberem tão bem. Agradeço juntamente os meus primos Jonatan, Mateus e Gabriela por me aceitarem e dividirem essa experiência comigo.

Aos meus primos Anthony Bonetti e Jonatan Luiz Gregorio, por não me abandonarem sequer um dia nessa etapa.

Aos professores que tive durante a minha vida, por todo o conhecimento transmitido.

À minha orientadora, professora Fernanda Barbosa Lima Christian, que mesmo não me conhecendo pessoalmente, confiou em mim e deixou trilhar o meu caminho da pesquisa em seu laboratório. Por sempre ter paciência e dedicação, por todas as conversas e por me aceitar como sua aluna de iniciação científica. Você teve um papel fundamental na minha formação! Muito obrigada!

À professora Domitila Augusta Huber, que sempre esteve presente dando todo o apoio, contribuições e carinho para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos professores, Cilene Lino de Oliveira e José Marino Neto, pelos espaços e equipamentos cedidos para a realização deste trabalho.

Aos professores, Alex Rafacho e Everson Araújo Nunes, pelos materiais cedidos para a realização deste trabalho.

Aos professores membros da banca: Eliane Maria Goldfeder, Gustavo Jorge dos Santos e Guilherme Fleury Fina Speretta por aceitarem o convite e pelas contribuições a este trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Flaviano Lorenzon, Bruna Barcelos de Simas, Jordana Laís de Rocco, Elisa Caroline Cella e Júlia Conte por toda ajuda e paciência. E mesmo nos momentos mais difíceis, jamais tiraram o sorriso do rosto e fizessem com que esse trabalho se tornasse realidade.

Aos colegas de departamento que sempre ajudaram sem medir esforços.

Aos sempre presentes, seu Carlos e Dona Vilma por todos os momentos que compartilhamos nesse período.

À equipe técnica do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia e ao Departamento de Morfologia da UFSC por todo o apoio.

À todos os meus amigos que estiveram comigo durante a minha vida e a minha graduação.

À minha amiga Nagilla, por ter entrado na minha vida, por compartilhar inúmeros momentos dentro e fora da faculdade. Obrigada por sempre me ouvir, me dar conselhos, trocar conhecimentos, pelo companheirismo e principalmente pela nossa amizade. Muito obrigada!

Às meninas que dividem apartamento comigo, Beatriz, Patrícia e Giovana, além de colegas de casa, vocês se tornaram minhas

irmãs. Obrigada por sempre estarem ao meu lado nessa caminhada!

Aos animais que mesmo sem entender, concederam e possibilitaram todos os estudos.

Agradeço a UFSC por ceder as instalações para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. No fundo, isto não tem muita importância. O que interessa mesmo não é à noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.

(“Sonho de uma noite de Verão”-

William Shakespeare, 1564-1616).

RESUMO

Mulheres na menopausa apresentam maior vulnerabilidade para distúrbios emocionais e o estresse psicossocial é um dos fatores que contribuem para o surgimento destes distúrbios. Após a menopausa o quadro se agrava, mas pode ser atenuado com o uso de terapia de reposição hormonal.

Nosso objetivo foi estudar as alterações da ciclicidade reprodutiva em um modelo de menopausa química em ratas tratadas com 4-vinilciclohexano diepóxido (VCD), um agente ovotóxico que leva à falha ovariana precoce, e submetidas a um estresse crônico imprevisível (ECI). As ratas foram submetidas ao tratamento com VCD aos 28 dias de idade durante 15 dias consecutivos.

Aproximadamente 80 e 180 dias após o tratamento, os animais foram submetidos ao protocolo de ECI e a ciclicidade estral foi verificada respectivamente, 6 e 10 dias antes de começar o ECI durante aproximadamente 15 dias. O material foi coletado através da técnica de esfregaços vaginais, para a identificação da fase do ciclo estral. Após eutanásia os ovários foram retirados e submetidos ao protocolo para elaboração de lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina para determinação da morfologia ovariana. A hipótese do presente trabalho era que a falha ovariana precoce poderia exacerbar os efeitos do estresse sobre a ciclicidade estral, aumentando a irregularidade dos ciclos e levando a anomalias na morfologia ovariana. Hipotetizamos ainda que esta exacerbação fosse ainda mais evidente nas ratas com maior tempo de falha ovariana (180 dias após tratamento com VCD).

Os resultados mostraram que as ratas tratadas com o VCD apresentaram ciclo irregular e quando submetidas ao ECI demonstraram uma irregularidade ainda mais notável, corroborando a nossa hipótese. A irregularidade foi mais evidente nas ratas com maior tempo de falha ovariana, indicando que o processo de envelhecimento prejudica a ciclicidade das ratas, principalmente quando estas apresentam falha ovariana e são submetidas ao ECI. Com relação à morfologia ovariana, tanto 80 quanto 180 dias pós- VCD, os animais estressados apresentaram

alterações significativas na morfologia ovariana, tais como aumento de cistos, e diminuição de folículos funcionais. O presente estudo conclui, portanto, que os fatores estresse, falha ovariana e envelhecimento, quando associados, agravam a irregularidade nos ciclos estrais e a morfologia ovariana das ratas, reduzindo sua capacidade reprodutiva.

Palavras chaves: menopausa, ciclo estral, estresse, morfologia ovariana.

ABSTRACT

Once women reach menopause they become more vulnerable to emotional disturbances. Psychosocial stress is one of the factors that contribute to the onset of these disorders. After menopause, the condition worsens but may be alleviated with the use of hormone replacement therapy.

Our objective was to study the changes in reproductive cyclicity in a model of chemical menopause in rats treated with 4-vinylcyclohexane diepoxide (VCD), an ovotoxic agent that leads to early ovarian failure and subjected to unpredictable chronic stress (ECI). Rats were treated with VCD at 28 days of age for 15 consecutive days.

Approximately 80 and 180 days after treatment, animals were submitted to the ECI protocol and estrous cycles were checked respectively, 6 and 10 days before ECI started for approximately

days. The material was collected through the technique of vaginal smears, to identify the phases of estrous cycle. After euthanasia ovaries were removed, sectioned and stained with hematoxylin and eosin for determination of ovarian morphology. The hypothesis of the present study was that early ovarian failure could exacerbate the effects of stress on estrous cycle, increasing irregularities. We hypothesized further that this exacerbation would be even more evident in rats with longer exposure to ovarian failure (180 days after VCD treatment).

The results showed that rats treated with VCD presented irregular cycles and this condition was worsened when they were submitted to ECI, corroborating our hypothesis. Estrous cycle irregularities were more evident in rats with longer exposure to ovarian failure, indicating that the aging process impairs cyclicity in rats, especially if they present ovarian failure and are submitted to ECI. Regarding ovarian morphology, both 80 and 180 days after VCD, the stressed animals presented significant alterations in ovarian morphology, such as an increased number of cysts and a reduced number of healthy follicles. The present study concludes, therefore, that factors like stress, ovarian failure and aging, when associated, aggravate the estrous cycle irregularity

and alter the ovarian morphology of rats, decreasing their reproductive capability.

Keywords: menopause, estrous cycle, stress, ovarian morphology.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Quadro esquemático dos estímulos que foram utilizados para o ECI.....	40
Quadro 2. Protocolo de processamento das amostras.....	42
Quadro 3. Protocolo de Coloração de Lâminas Histológicas.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático dos grupos experimentais.	38
Figura 2. Massa corporal (g) dos animais estudados 80 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo..	48
Figura 3. Peso relativo dos ovários dos animais estudados aos 80 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo.....	49
Figura 4. Ciclicidade do grupo controle 80 dias após a administração de veículo (óleo de milho), não exposto ao protocolo de ECI.	50
Figura 5. Ciclicidade do grupo controle 80 dias após a indução de óleo de milho, exposto ao protocolo de ECI.	51
Figura 6. Ciclicidade do grupo VCD 80 dias após a indução de VCD, não exposto ao protocolo de ECI.....	52
Figura 7. Ciclicidade do grupo VCD 80 dias após a indução de VCD, exposto ao protocolo de ECI.	53
Figura 8. Quantificação de folículos primordiais e primários dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo.	54
Figura 9. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL sem a indução ao ECI. A flecha aponta um folículo primordial.	55
Figura 10. Quantificação de folículos antrais dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo.....	56
Figura 11. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL sem a indução ao ECI. As flechas mostram folículos antrais.....	57
Figura 12. Quantificação de corpos lúteos em ratas 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo..	58
Figura 13. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL com a indução ao ECI. As flechas apontam corpos lúteos..	59

Figura 14. Quantificação de cistos em ratas estudadas 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo.....	60
Figura 15. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL com a indução ao ECI, encontra-se destacado C.....	61
Figura 16. Quantificação de folículos funcioanais dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo.....	62
Figura 17. Dosagem de estradiol dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo.....	63
Figura 18. Dosagem de progesterona (ng/mL) dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo.....	64
Figura 19. Massa corporal (g) dos animais estudados 180 dia após o início do tratamento com VCD ou óleo.....	65
Figura 20. Peso relativo dos ovários dos animais estudados aos 180 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo..	66
Figura 21. Ciclicidade do grupo CTL 180 dias após a indução de óleo de milho, não exposto ao protocolo de ECI.	67
Figura 22. Ciclicidade do grupo CTL 180 dias após a indução de óleo de milho, exposto ao protocolo de ECI.....	68
Figura 23. Ciclicidade do grupo VCD 180 dias após a indução do VCD, não exposto ao protocolo de ECI.	69
Figura 24. Ciclicidade do grupo VCD 180 dias após a indução de VCD, exposto ao protocolo de ECI.	70
Figura 25. Quantificação de folículos primordiais dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo.....	71
Figura 26. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL sem a indução ao ECI, encontra-se destacado FP.	72
Figura 27. Quantificação de folículos antrais dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo.....	73
Figura 28. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo VCD com a indução ao ECI, encontra-se destacado FA..	74
Figura 29. Quantificação de corpo lúteos dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo.	75

Figura 30. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL sem a indução ao ECI, encontra-se destacado CL.....	76
Figura 31. Quantificação de cistos dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo.....	77
Figura 32. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL sem a indução ao ECI, encontra-se destacado C.	78
Figura 33. Quantificação de folículos funcioanis dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo.....	79
Figura 34. Dosagem de estradiol dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo.	80
Figura 35. Dosagem de progesterona dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo.....	81
Figura 36. Quantificação de folículos primordiais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com óleo, expostos e não ao protocolo de ECI.	82
Figura 37. Quantificação de folículos primordiais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com VCD, expostos e não ao protocolo de ECI.	83
Figura 38. Quantificação de folículos antrais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com óleo de milho, expostos e não ao protocolo de ECI.....	84
Figura 39. Quantificação de folículos antrais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com VCD, expostos e não ao protocolo de ECI.	85
Figura 40. Quantificação de corpo lúteo dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com óleo de milho, expostos e não ao protocolo de ECI.	86
Figura 41. Quantificação dose corpos lúteos dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com VCD, expostos e não ao protocolo de ECI.	87

Figura 42. Quantificação de cistos dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com óleo de milho, expostos e não ao protocolo de ECI.....	88
Figura 43. Quantificação de cistos dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com VCD, expostos e não ao protocolo de ECI.....	89
Figura 44. Quantificação de folículos funcionais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com óleo de milho, expostos e não ao protocolo de ECI.....	90
Figura 45. Quantificação de folículos funcionais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com VCD, expostos e não ao protocolo de ECI. .	91

LISTA DE SIGLAS

ACTH- hormônio adrenocorticotrófico
C- Folículo atresico ou cisto
CL- corpo lúteo
CRF- corticotrofina
CTL- controle
ECI- estresse crônico imprevisível
FA- folículo antral
FP- folículo primordial e folículo primário
FF- folículo funcional
FSH- hormônio folículo-estimulante
GnRH- hormônio liberador de gonadotrofinas
HPA- eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HPG- eixo hipotálamo-hipófise-gônadas
LH- hormônio luteinizante
PBS- tampão fosfato-salino
PFA- paraformaldeído
POMC- pro-opiomelanocortina
PVN- núcleo paraventricular do hipotálamo
RIA- radioimunoensaio
VCD- 4-vinilciclohexano diepóxido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1.1 Estresse.....	29
1.2 Estresse e menopausa	30
1.3 Ciclicidade	31
1.4 Ação hormonal na maturação dos folículos ovarianos	33
1.5 VCD: modelo experimental de menopausa	33
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivos Gerais.....	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Animais	36
4.2 Indução da falha ovariana:	36
4.3. Estresse crônico imprevisível.....	38
4.4 Esfregaços Vaginais	40
4.5 Perfusão e extração dos órgãos.....	40
4.6 Processamento dos ovários.....	41
4.7 Inclusão dos ovários.....	43
4.8 Secção dos ovários.....	43
4.9 Coloração das Lâminas Histológicas.....	43
4.11 Captura de Imagem das Lâminas Histológicas.....	46

4.13	Peso Relativo dos ovários	46
4.14	Análise da Ciclicidade Estral.....	46
4.15	Análise histológica dos ovários	46
4.16	Dosagem Hormonal	47
4.17	Análise estatística.....	47
5.	RESULTADOS	48
5.1	Animais estudados 80 dias após a administração de VCD ou óleo (perimenopausa).....	48
5.1.1	Massa corporal e peso relativo dos ovários	48
5.1.2	Ciclicidade Estral	49
5.1.3	Morfologia ovariana.....	53
5.1.4	Dosagem hormonal.....	62
5.2	Animais estudados 180 dias após a administração de VCD ou óleo (menopausa)	64
5.2.1	Massa corporal e peso relativo dos ovários	64
5.2.2	Ciclicidade Estral	66
5.2.3	Morfologia Ovariana.....	71
5.2.4	Dosagem Hormonal	79
5.3	Resultados da Interação do Envelhecimento e Estresse na Morfologia Ovariana.....	81
6.	DISCUSSÃO	92
6.1	Animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD	92
6.1.1	Ciclicidade Estral	92
6.1.2	Morfologia Ovariana.....	93

6.2 Animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD	95
6.2.1 Ciclicidade Estral.....	95
6.2.2 Morfologia Ovariana	96
7. CONCLUSÃO	99
8.BIBLIOGRAFIA	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse

Estresse pode ser considerado como qualquer alteração fisiológica ou psicológica no organismo que altere a sua homeostasia. Existem diferentes tipos de estresses, psicológicos ou fisiológicos, que podem, consequentemente, gerar mudanças comportamentais e/ou fisiológicas. Entre estas alterações podemos destacar a aparição de alguns transtornos mentais como depressão, ansiedade ou esquizofrenia (Steenbergen *et al.*, 1991; Ottenweller *et al.*, 1992; Rodgers & Cole, 1993), como também a hipoatividade, anorexia ou perda de peso (Dess *et al.*, 1989; Blanchard *et al.*, 1990; Woodmansee *et al.*, 1993).

A manutenção da homeostasia depende de adaptações, sejam elas comportamentais, autonômicas ou endócrinas, que permitam o controle das disfunções desencadeadas pelo estresse (Aguilera, 1998).

Sinais que convergem para uma via comum, representada pelos neurônios da divisão parvocelular do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, são indicativos de estresse, e estes sinais são integrados no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Os neurônios existentes no PVN sintetizam o fator liberador de corticotrofina (CRF), que é liberado na eminência média e liga-se aos receptores de membranas dos corticotrofos da pituitária anterior. Desta maneira, ocorre o aumento da liberação da pro-opiomelanocortina (POMC), sendo este o peptídeo precursor do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este hormônio age sobre seus receptores no córtex da glândula adrenal resultando, então, na síntese e secreção dos glicocorticóides, principalmente, corticosterona em roedores e cortisol nos primatas (Akil & Morano, 1995). Além disso, o sistema nervoso autônomo simpático é ativado em qualquer situação de estresse, levando a alterações rápidas nos estados fisiológicos, por meio da ativação neuronal e a liberação de epinefrina pela região medular das glândulas adrenais (Ulrich-Lai & Herman, 2009).

Alterações no eixo HPA e na regulação autonômica, evocadas pela exposição ao estresse, dependem de fatores como a

previsibilidade, intensidade e também a natureza do estímulo estressor. Animais que são expostos à natação forçada por 20 minutos durante 14 dias demonstram uma maior concentração plasmática de corticosterona no último dia de estresse, quando comparados aos animais que são submetidos ao estresse apenas uma vez (Dal-Zotto *et al.*; 2000). Logo, quando os animais são expostos diversas vezes ao mesmo estresse, ocorrerá o processo de dessensibilização, que é a diminuição da atividade dos receptores sem alteração do seu número total (Coelho, T.H. *et.al.*,2002).

Em nosso estudo, foi utilizado um modelo já reconhecido na literatura para mimetizar estados de depressão (Zhang *et al.*, 2012), chamado de Estresse Crônico Imprevisível (ECI). Durante o ECI os animais são expostos a estressores imprevisíveis tais como restrição de movimento, exposição à luz contínua e privação de alimento por um período crônico (10 dias) (Willner *et al.*,1987). Este tipo de estresse resulta em anedonia (diminuição da resposta a estímulos prazerosos), redução de atividade locomotora, aumento da frequência cardíaca e do tônus simpático cardíaco (Grippe *et al.*, 2003).

1.2 Estresse e menopausa

A menopausa é a fase da vida da mulher que cessa a capacidade reprodutiva (OMS, 1996, p.1), onde há a extinção total do ciclo menstrual pelo período mínimo de um ano. Durante a transição menopausal o estoque de folículos vai reduzindo, fazendo então com que haja a diminuição da secreção dos hormônios estrógeno e progesterona pelos ovários. Com isso, ocorre a diminuição do feedback negativo gerado por esses hormônios no eixo hipotálamo-hipofisário, aumentando assim a síntese e secreção das gonadotrofinas, o hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pela hipófise. Com o aumento do FSH circulante ocorre um maior recrutamento folicular e, conseqüentemente, uma perda folicular acelerada. Quando a maior parte dos folículos ovarianos está esgotada, o ovário é incapaz de responder aos altos níveis de FSH e os níveis

de estradiol e progesterona ficam reduzidos, caracterizando assim a pós-menopausa (Hall, 2007).

Estudos demonstram que mulheres possuem um nível de estresse psicossocial maior do que os homens (Thurston & Kubzansky, 2007). Quando as mulheres entram na menopausa, a vulnerabilidade ao estresse fica aumentada e o estado ainda mais crítico. Além disso, há maior chance de desenvolvimento de déficits cognitivos em decorrência do estresse (Almela *et al.*, 2011). Na menopausa há um aumento da resposta simpato-adrenal, a qual pode ser atenuada com o uso de terapia de reposição hormonal (Kajantie & Phillips, 2006).

A reposição dos hormônios ovarianos pode atenuar a exacerbação da resposta a estressores psicossociais após a menopausa (Ceresini *et al.*, 2000). Almela e colaboradores demonstraram, em 2011, um impacto agudo do estresse no desempenho de mulheres em testes de memória, com uma correlação significativa com altos níveis de cortisol. Este dado corrobora a importância dos hormônios sexuais como fatores críticos na relação entre estresse e cognição.

1.3 Ciclicidade

O estudo do ciclo reprodutivo em roedores já é validado na literatura e bastante utilizado por ser curto, regular e de difícil interrupção (Caligioni & Franci, 2002). Nas mulheres o ciclo reprodutivo é denominado ciclo menstrual, tendo uma duração média de 28 dias enquanto em roedores o ciclo é conhecido por ciclo estral e seu período de tempo é bem mais curto, durando de 4 a 5 dias.

As células vaginais que podem ser coletadas por meio de esfregaços vaginais são utilizadas para determinarmos em que período do ciclo estral as ratas se encontram, por determinar a influência dos hormônios ovarianos na morfologia do epitélio vaginal (Long & Evans, 1922).

Este método de coleta propõe a observação de três tipos de células encontradas no esfregaço vaginal as quais definem o período do ciclo em que as ratas se encontram. As células encontradas são: células epiteliais, células cornificadas e

leucócitos (Marcondes, 2002). O ciclo estral em roedores é dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro. As características de cada fase são descritas abaixo:

Proestro: neste período há dominância de células epiteliais nucleadas, que podem aparecer agrupadas ou individualmente. Ainda é comum aparecerem células cornificadas, significando que a rata está no período pré-ovulatório, onde vai ocorrer o aumento dos níveis de estradiol e (Walmer *et al.*, 1992), consequentemente, no final da tarde os níveis de FSH e LH também aumentam, ocorrendo a ovulação (Parkening *et al.*, 1982). Essa fase dura em média de 12 a 18 horas começando no período da noite.

Estro: nesta fase há a predominância de células epiteliais cornificadas, núcleo não visível e formato irregular. A madrugada do estro é o período em que a fêmea exibe os comportamentos sexuais e está receptiva ao coito. Após a receptividade, os níveis de estradiol permanecem altos durante a manhã e começam a baixar à tarde (Walmer *et al.*, 1992). Este período possui aproximadamente 12 horas.

Metaestro: neste período nota-se uma combinação de todos os tipos de células, mas com uma predominância de leucócitos. Nesta fase os níveis de estradiol já se apresentam reduzidos (Walmer *et al.*, 1992), com duração de 12 horas.

Diestro: este período tem a predominância total de leucócitos. Nesta fase, a concentração plasmática de E começa a se elevar novamente (Walmer *et al.*, 1992). Este período é o mais longo, durando aproximadamente de 48 a 62 horas.

Durante o ciclo estral, os níveis de LH e FSH permanecem baixos durante todo o ciclo (Parkening *et al.*, 1982), porém para ocorrer o pico pré ovulatório, o LH aumenta. Esse aumento ocorre devido o efeito de retroalimentação de E no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) ocorre no período de proestro (Freeman *et al.*, 1976). Quando as concentrações de LH e FSH aumentam, as ratas atingem a ovulação, já os níveis de E são baixas durante o estro e o começo do metaestro. A P mostra um pico de concentração no final do proestro e início do estro,

muito próximo ao pico pré ovulatório e o segundo pico corre no final do metaestro e começo do diestro.

1.4 Ação hormonal na maturação dos folículos ovarianos

O processo de maturação do ovócito é regulado principalmente pela ação dos hormônios FSH e LH (Aires, M.M, 2008). O proestro e estro são conhecidos como fases ploriferativas, sendo nessas fases o principal alvo de ação dos hormônios citados. O FSH estimula a ploriferação das células da camada granulosa do ovário, a secreção de E pelas células da teca interna, o desenvolvimento folicular e manifestações do estro ou cio (Scalzilli, B; Pereira, J. & Moraes, I.A 2015).

Quando ocorre o aumento crescente na concentração de estrógeno, ocorre um feedback negativo que inibe a liberação de FSH, por conseguinte um mecanismo de feedback positivo estimulando a liberação de LH, a qual é responsável pelo término da maturação folicular, causando então a ovulação (Scalzilli, B; Pereira, J. & Moraes, I.A 2015).

Contudo, as fases metaestro e diestro são chamadas de fases secretoras. Posteriormente à ovulação, acontece a luteinização da parede folicular, formando então um corpo lúteo, sendo este responsável pela síntese de progesterona e estrógeno, que agem na inibição da liberação de LH. Não ocorrendo a fecundação, ocorre uma grande liberação de GnRH pelo hipotálamo, aumentando os níveis de LH e FSH, podendo então a rata iniciar um novo ciclo estral (Scalzilli, B; Pereira, J. & Moraes, I.A 2015).

1.5 VCD: modelo experimental de menopausa

Por um longo tempo, o modelo mais utilizado para o estudo de menopausa em animais foi a ovariectomia, onde ocorre a retirada dos ovários e uma queda brusca dos hormônios ovarianos (Acosta *et al.*, 2009). Entretanto, este modelo não mimetiza de maneira satisfatória a menopausa humana, pois com a retirada dos ovários há uma queda abrupta dos hormônios ovarianos o que não ocorre em mulheres.

No presente trabalho, foi utilizado um composto químico denominado 4-vinilciclohexano-diepóxido (VCD), que leva a uma falha ovariana precoce, resultando em um animal depletado de folículos, mas que ainda tenha resíduo de tecido ovariano, da mesma forma que ocorre na menopausa (Kao *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 2004; Springer *et al.*, 1996). Esse composto destrói folículos primordiais e primários por meio de apoptose (atresia folicular). Então, essa depleção dos folículos ovarianos, leva à queda dos níveis de E e P, já que esses folículos são os principais produtores dos hormônios ovarianos.

Após 80 dias da administração do VCD, os animais já começam a apresentar falha ovariana, que por ocorrer em adultos jovens é chamada de falha ovariana precoce. Um estudo mostrou que com 60 dias após a administração do VCD já há uma diminuição significativa do número de folículos primários e primordiais, progredindo até 360 dias depois da administração (Mayer *et al.*, 2002). Logo, este é um modelo animal adequado para representar a passagem gradual entre os períodos da perimenopausa e menopausa.

2. JUSTIFICATIVA

Embora a resposta ao estresse possa ser disparada por estresses fisiológicos, psicossociais ou a combinação de ambos, a grande maioria dos indivíduos encontra-se exposta mais frequentemente aos do tipo psicossocial (Lundber, 2005). O estresse está presente na vida cotidiana de ambos os gêneros, no entanto, estudos demonstram que a ocorrência de estresse psicossocial em mulheres é maior do que em homens (Thurston & Kubzansky, 2007) e na fase de menopausa o problema fica exacerbado. O entendimento dos mecanismos pelos quais o estresse interfere na fisiologia reprodutiva em jovens e na meia idade é importante, pois dará suporte para a discussão dos reais gatilhos que desencadeiam a sintomatologia da menopausa. Este entendimento deve pautar-se no princípio de que nesta fase pode haver a sobreposição do processo de envelhecimento, do declínio dos hormônios ovarianos e do estresse, seja ele fisiológico ou psicossocial. Sendo assim, o estudo no modelo experimental aqui

proposto nos possibilita avaliar cada um destes processos separadamente, o que permite uma compreensão mais ampla do período de climatério, no que diz respeito à ciclicidade e à morfologia ovariana, que envolve as flutuações hormonais da perimenopausa e o declínio de alguns hormônios na menopausa instalada. A compreensão destes mecanismos abre novas perspectivas para possíveis tratamentos alternativos para os sintomas adversos deste período.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar a influência do estresse crônico imprevisível e da idade sobre a ciclicidade estral e a morfologia ovariana de ratas Wistar com ou sem falha ovariana precoce induzida por VCD.

3.2 Objetivos específicos

1- Avaliar se o estresse crônico imprevisível pode diminuir a regularidade na ciclicidade estral de ratas Wistar com e sem falha ovariana precoce.

2- Avaliar se o estresse crônico imprevisível pode alterar a morfologia ovariana de ratas Wistar e/ou exacerbar os efeitos deletérios da falha ovariana precoce.

3- Investigar se os efeitos do estresse crônico imprevisível sobre a regularidade na ciclicidade estral de ratas Wistar com e sem falha ovariana precoce são influenciados pela idade, comparando-se fêmeas jovens e de meia-idade.

4- Investigar se os efeitos do estresse crônico imprevisível sobre a morfologia ovariana de ratas Wistar com e sem falha ovariana precoce são influenciados pela idade, comparando-se fêmeas jovens e de meia-idade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizadas ratas Wistar, de 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Trindade, Florianópolis, SC. As ratas foram mantidas em gaiolas plásticas (30 x 19 x 13 cm) sob um ciclo claro-escuro de 12h invertido (luzes acesas às 18:00h) e temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Água e ração foram oferecidos *ad libitum*. Os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto já estão aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC – Nº PP00832 e PP00842.

4.2 Indução da falha ovariana:

No dia em que as ratas atingiram 28 dias de vida o tratamento com VCD (Sigma, V3630) foi iniciado. Cada fêmea recebeu uma injeção diária intraperitoneal contendo óleo de milho-placebo (grupo controle - CTL) ou VCD (160mg/Kg) por 15 dias consecutivos.

-Grupos Experimentais:

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

1) Grupo controle 80 dias (perimenopausa) sem exposição ao ECI: ratas tratadas com óleo de milho aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 80 dias após o início do tratamento – CTL s/ ECI 80 (n=6-ciclicidade/ 8-morfologia ovariana).

2) Grupo CTL 80 dias (perimenopausa) com exposição ao ECI: ratas tratadas com óleo de milho aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 80 dias após o início do tratamento - CTL c/ ECI 80 (n=7-ciclicidade/ 7- morfologia ovariana).

3) Grupo VCD 80 dias (perimenopausa) sem exposição ao ECI: ratas tratadas com VCD aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 80 dias após o início do tratamento - VCD s/ ECI 80 (n=6-ciclicidade/ 6- morfologia ovariana).

4) Grupo VCD 80 dias (perimenopausa) com exposição ao ECI: ratas tratadas com VCD aos 28 dias de idade por 15 dias

consecutivos foram estudadas 80 dias após o início do tratamento– VCD c/ ECI 80 (n=8-ciclicidade/ 8- morfologia ovariana).

5) Grupo controle 180 dias (menopausa) sem exposição ao ECI: ratas tratadas com óleo de milho aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 180 dias após o início do tratamento - CTL s/ ECI 180 (n=13-ciclicidade/ 8- morfologia ovariana).

6) Grupo controle 180 dias (menopausa) com exposição ao ECI: ratas tratadas com óleo de milho aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 180 dias após o início do tratamento - CTL c/ ECI 180 (n=16-ciclicidade/ 6- morfologia ovariana).

7) Grupo VCD 180 dias (menopausa) sem exposição ao ECI: ratas tratadas com VCD aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 180 dias após o início do tratamento - VCD s/ ECI 80 (n=12-ciclicidade/ 7- morfologia ovariana).

8) Grupo VCD 180 dias (menopausa) com exposição ao ECI: ratas tratadas com VCD aos 28 dias de idade por 15 dias consecutivos foram estudadas 180 dias após o início do tratamento - VCD c/ ECI 180 (n=12-ciclicidade/ 7- morfologia ovariana).

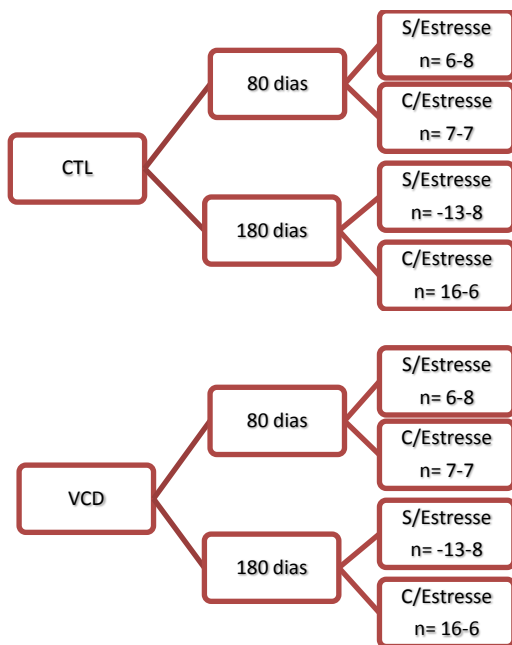


Figura 1. Desenho esquemático dos grupos experimentais.

4.3. Estresse crônico imprevisível

Aproximadamente dez dias antes de completarem 80 ou 180 dias após o início do tratamento com VCD, os animais foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível, modelo já validado na literatura (Zhang *et al.*, 2012; Grippo *et al.*, 2003; Willner *et al.*, 1987), que consiste na aplicação, duas vezes ao dia, de diferentes estímulos estressores ao longo de dez dias. Os estímulos utilizados foram: imobilização por uma hora, inversão do ciclo circadiano, nado forçado durante 5 minutos, privação hídrica e alimentar no decorrer de 12 horas e exposição ao frio (4°C) por uma hora. A descrição e o quadro esquemático de cada estímulo encontram-se a seguir:

Imobilização: o aparato utilizado para imobilização consiste em um cilindro de PVC branco de 20 cm de

comprimento e 6 cm de diâmetro, com uma das extremidades parcialmente fechada, apenas com uma abertura central para exteriorizar a cauda do animal e evitar que esta permaneça em uma posição desconfortável, evitando estresse maior que o desejado e a outra, com aberturas para circulação de ar.

Nado forçado: Os animais foram colocados em tanques de PVC opaco (marrom) com capacidade para 50 L e preenchido com água a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), de maneira que a cauda do animal não encostasse no fundo do recipiente. Ao final de 5 minutos, os animais foram cuidadosamente secos e recolocados em suas caixas moradias.

Isolamento frio: os animais foram colocados em caixas sem maravalha, água ou comida, no refrigerador para que fossem expostos a uma temperatura de 4 ± 2 °C durante 60 min, ao término desse tempo, foram devolvidos às suas caixas moradias e às condições ideais de temperatura.

Privação hídrica e alimentar: Os animais permaneceram em condições ideais de temperatura e exaustão e durante 12 horas, as garrafas de água e a ração foram retiradas das caixas moradias, ao final desse tempo, a ração e a água foram repostas.

Inversão do ciclo circadiano: os animais foram mantidos em suas caixas moradias e acondicionados em uma sala com condições ideais de temperatura e exaustão onde o ciclo circadiano foi invertido: luz apagada no período claro ou luz acesa no período escuro.

Dia	Tipo de Estresse	Horário
1	Imobilização por 60 minutos	Manhã
	Natação forçada por 5 minutos	Tarde
2	Isolamento/frio por 60 minutos	Manhã
	Luz apagada à noite	Noite
3	Privação hídrica e alimentar	Manhã
	Imobilização por 60 min	Tarde
4	Natação forçada por 5 minutos	Manhã
	Isolamento/frio por 60 minutos	Tarde

5	Luz acesa de dia	Manhã e tarde
	Privação hídrica e alimentar	Tarde
6	Imobilização por 60 min	Manhã
	Natação forçada por 5 minutos	Tarde
7	Isolamento/frio por 60 minutos	Manhã
	Luz apagada à noite	Noite
8	Privação hídrica e alimentar	Manhã
	Imobilização por 60 min	Tarde
9	Natação forçada por 5 minutos	Manhã
	Isolamento/frio por 60 minutos	Tarde
10	Luz acesa de dia	Manhã e tarde
	Privação hídrica e alimentar	Tarde

Quadro 1. Quadro esquemático dos estímulos que foram utilizados para o ECI.

4.4 Esfregaços Vaginais

Aproximadamente 20 dias antes de completarem 80 ou 180 dias do início do tratamento com o VCD, foi iniciada a verificação da ciclicidade das ratas através da realização de esfregaços vaginas, que eram realizados uma vez ao dia no período da manhã até completarem as respectivas datas. Para isso as ratas foram imobilizadas e a ponta de uma pipeta de plástico preenchida com solução salina (0,9%), foi introduzida no canal vaginal e então este foi lavado.

O material coletado foi depositado em lâminas delimitadas por poços numerados e levadas ao microscópio de luz para a identificação da fase do ciclo estral através da caracterização citológica, conforme descrito anteriormente.

4.5 Perfusão e extração dos órgãos

Após o término dos registros dos parâmetros cardiovasculares (protocolo realizado no mesmo laboratório, utilizando-se os mesmo animais, em respeito aos 3Rs no uso de

animais de experimentação). Os animais foram anestesiados com uretana (1.3 g/ kg, i.p) que tem sido amplamente utilizada devido ao seu nível estável de longa duração da anestesia com efeitos mínimos sobre os sistemas fisiológicos (Zheng & Zhang, 2013) e foram avaliados os reflexos palpebral, pupilar e interdigital.

Com o animal em plano cirúrgico, foi realizada coleta de sangue intracardíaca e para a coleta de tecidos foi feita uma incisão longitudinal mediana na pele e musculatura, iniciada na região pré-pubiana na direção caudo-cranial até o manúbrio. O sangue foi centrifugado a 400G e o plasma armazenado a -20°C. Auxiliado por uma pinça cirúrgica o esterno foi elevado, e com uma tesoura o diafragma foi perfurado e as costelas cortadas, com o objetivo de expor o coração e realizar a perfusão intracardíaca.

O ventrículo esquerdo foi perfurado com uma agulha conectada a um cateter ligado a frascos contendo solução de sacarose (9,25%) heparinizada ou paraformaldeído (PFA) a 4% dissolvido em PBS (0,1M).

Para gerenciar a passagem das soluções, a agulha com o cateter possui um adaptador que permite escolher qual dos líquidos deve passar pela agulha e consequentemente para o animal. O adaptador foi aberto somente após pequeno corte no átrio direito do animal, permitindo a passagem de sacarose em uma quantidade suficiente para retirar o sangue dos tecidos do animal (± 200 ml). Em seguida, foi interrompida a passagem da sacarose e permitida à passagem de PFA 4%, até os animais ficarem rígidos (± 200 ml). Posteriormente a perfusão, os

órgãos de interesse foram visualizados e identificados. Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura, foram removidos na seguinte ordem: ovário esquerdo e ovário direito. Depois da remoção, os órgãos foram identificados, pesados e fixados em PFA 4%.

4.6 Processamento dos ovários

Após eutanásia ovários foram coletados, dissecados e pesados para verificação da ação do VCD sobre a morfologia ovariana. Os ovários foram pesados individualmente, e seu peso relativo foi calculado. As amostras que estavam armazenadas em PFA 4% foram retiradas para começar o protocolo de inclusão

dos órgãos. Estas foram colocadas em álcool 70% individualmente em cassetes histológicos identificados, e deixadas em média 12 horas imersas.

Posteriormente, as amostras foram levadas ao Processador de Amostras Leica TP1020, no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB-UFSC), no qual seguiram o seguinte protocolo:

Etapas	Estágio	Reagente	Duração
1	Desidratação	Álcool Etílico 70%	1 h
2	Desidratação	Álcool Etílico 80%	1 h
3	Desidratação	Álcool Etílico 90%	1 h
4	Desidratação	Álcool Etílico 100% I	1 h
5	Desidratação	Álcool Etílico 100% II	1 h
6	Diafanização	Xilol I (1/1 de Álcool Etílico 100% e Xilol)	40 min
7	Diafanização	Xilol II	40 min
8	Inclusão Intermediária	Parafina I	3 h
9	Inclusão Intermediária	Parafina II	3 h
10	Inclusão Definitiva	Parafina III	3 h
Tempo Total			15h20min

Quadro 2. Protocolo de processamento das amostras.

4.7 Inclusão dos ovários

Logo após o término do processamento das amostras, estas foram levadas ao equipamento Emblocador de amostras Leica EG1150H, também proveniente do LAMEB-UFSC. Com a parafina em estado líquido, os cassetes foram transferidos para o recipiente de ambientação, onde permaneceu de 40 a 60 minutos para adequar-se a temperatura.

Em seguida, foram feitas as identificações das amostras. As formas ficaram em uma placa aquecida, enquanto um dos cassetes era retirado do banho de parafina. Posteriormente, a forma foi preenchida com parafina e os dois ovários imersos. Após orientar a amostra, o material foi levado a uma placa fria para a solidificação da parafina e consequentemente a formação do bloco. O material terminou de endurecer em temperatura ambiente para não formar rachaduras.

Quando já estavam bem solidificados, os blocos foram desenformados e levados à geladeira para serem cortados posteriormente.

4.8 Secção dos ovários

Depois de 24 horas emblocados a 4°C, os ovários foram levados ao Micrótomo Rotativo Leica RM2255 do LAMEBe seccionados na espessura de 5µm. Assim que o seccionamento alcançou o material, os filetes de parafina foram colocados em banho-maria contendo 8 gramas de gelatina sem sabor diluídos em 4 litros de água. Os cortes foram seccionados de maneira semi-seriada a cada 10 secções, gerando um total de três lâminas histológicas por animal, contendo três cortes em cada lâmina. A parafina ficou em média 5 minutos no banho-maria para que pudesse esticar o tecido e em seguida os cortes foram colocados em lâminas histológicas e seguiram para secagem ao ar livre.

4.9 Coloração das Lâminas Histológicas

Depois do material seco, as lâminas histológicas foram para o equipamento Sistema de Coloração de Lâminas Leica AutoStainer XL proveniente do LAMEB-UFSC e seguiram o protocolo abaixo:

Etapa	Estágio	Reagente	Duração
1	Desparafinização	Estufa 45°C	40 min
2	Desparafinização	Xilol I	10 min
3	Desparafinização	Xilol II	10 min
4	Hidratação	Álcool Etílico 100%	5 min
5	Hidratação	Álcool Etílico 100% II	5 min
6	Hidratação	Álcool Etílico 80%	5 min
7	Hidratação	Álcool Etílico 70%	5 min
8	Hidratação	Álcool Etílico 50%	5 min
9	Lavagem	Água	10 min
10	Coloração	Hematoxilina	5 min
11	Lavagem	Água corrente	6 min
12	Coloração	Eosina	8 min
13	Lavagem	Água corrente	1 min
14	Desidratação	Álcool Etílico 70%	2 min
15	Desidratação	Álcool Etílico 100% I	3 min
16	Desidratação	Álcool Etílico 100% II	3 min
17	Fixação do corante e conservação do material	Xilol I (1/1: Álcool100% / Xilol)	5 min
18	Fixação do corante e conservação do material	Xilol II	10 min
Tempo Total			2h18min

Quadro 3. Protocolo de Coloração de Lâminas Histológicas.

Após o término do protocolo de coloração as lamínulas foram colocadas. Com um bastão de vidro, foi apanhado Bálsamo do Canadá sintético e colocado sobre a lamínula e a lâmina sobreposta. Depois disso, foram retirados os excessos de bolhas de ar e colocadas para secar ao ar livre pelo período mínimo de uma semana para posterior análise.

4.10 Caracterização Citológica

Na elaboração deste trabalho, foram observados quatro tipos de folículos ovarianos, e para a sua quantificação suas características morfológicas foram diferenciadas da seguinte maneira:

Folículo Primordial e Primário (FP): consiste em um ovócito primário envolvido por uma camada de células foliculares achatadas, sendo que a maior parte desses folículos se localiza na região cortical do ovário, próximo à túnica albugínea (Junqueira, Uchoa L.C; Carneiro, J., 2004).

Folículo Antral (FA): os folículos crescem, migrando para áreas mais profundas da região cortical e, uma quantidade de líquido, conhecido como líquido folicular, este começa a se concentrar entre as células foliculares. Os espaços intercelulares que contêm esse fluído se juntam e as células que fazem parte da camada granulosa se remodelam dando origem ao antro folicular, que é uma cavidade. As células da granulosa se reorganizam e formam um pequeno espessamento para proteção do ovócito, juntamente com a corona radiata (Junqueira, Uchoa L.C; Carneiro, J., 2004).

Corpo Lúteo (CL): é formado após a ovulação, onde as células da granulosa e da teca se modificam em células luteínicas.

Folículo Atrésico ou Cisto (C): folículos em degeneração e são caracterizados pela presença de fibroblastos e também pelo descolamento da camada da teca interna.

Folículo Funcional (FF): neste trabalho foi categorizada a contagem de folículos funcionais que se deu através da soma dos FP e FA.

4.11 Captura de Imagem das Lâminas Histológicas

Para a visualização da morfologia ovarina, a captura de imagens foi feita por meio do Microscópio Estereomicroscópio Olympus SZX16, com câmera digital colorida DP73 – 17mpixel, sendo utilizado o sistema de captura de imagens CellSens Dimension 1.12. Desta forma, as imagens que melhor representaram cada grupo experimental foram fotografadas e anexadas neste trabalho.

4.12 Massa Corporal

Anteriormente a perfusão, os animais foram pesados e com estes dados foram feitas as análises da massa corporal.

4.13 Peso Relativo dos ovários

O peso relativo dos ovários foi definido pela soma dos ovários direito e esquerdo dividido por dois, sendo em seguida dividida novamente pelo peso corporal do animal, após multiplicado por 100, como mostra a fórmula a seguir:

$$\frac{(\text{Peso do ovário direito} + \text{Peso do ovário esquerdo}) \div 2}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

4.14 Análise da Ciclicidade Estral

Os dados referentes às fases do ciclo foram analisados qualitativamente e expressos em gráficos para melhor visualização dos resultados.

4.15 Análise histológica dos ovários

Para a análise da morfologia ovariana foi utilizado um microscópio óptico na objetiva de 4X para delimitação da área a ser analisada. As objetivas de maior aumento foram utilizadas sempre que era necessário identificar os tipos celulares que

determinam as estruturas ovarianas estudadas, sendo FP, FA, CL, FF e C, já citadas no item 4.10.

Os folículos ovarianos (FP, FA, CL, FF e C) foram quantificadas para futuras comparações entre os grupos experimentais.

4.16 Dosagem Hormonal

Para a dosagem de progesterona, as amostras de plasma foram enviadas para a Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, e dosadas por radioimunoensaio (RIA) de duplo anticorpo na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP-USP, de acordo com o protocolo utilizado em Reis e cols. (2014). Resumidamente, o ensaio foi realizado utilizando-se um kit específico da MP Biomedicals (MP Biomedicals; Orangeburg-NY, USA). O menor limite de detecção para a progesterona foi de 0,02ng/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 5%. Todas as amostras foram dosadas em duplicata e no mesmo ensaio, para evitar variações inter-ensaios.

As dosagens de estradiol foram realizadas por meio da técnica de quimioluminescência, por uma empresa terceirizada especializada em dosagem hormonais em animais (Citovet Lab., Florianópolis, SC, Brasil). Os resultados foram dados em pg/mL.

4.17 Análise estatística

Todos os dados foram analisados estatisticamente usando o software Graph Pad Prism 6.0 (San Diego, Ca, EUA). Para todos os parâmetros foi utilizado ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey, e quando necessário Teste T de Student. Os fatores analisados foram “estresse” e “tratamento com VCD”. Nas análises da interação entre envelhecimento e estresse, os fatores analisados foram “idade” e “estresse”. Os dados estão apresentados no texto e gráficos como média \pm desvio padrão da média. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Animais estudados 80 dias após a administração de VCD ou óleo (perimenopausa)

5.1.1 Massa corporal e peso relativo dos ovários

Antes do protocolo cirúrgico foi determinada a massa corporal dos animais. A figura 2 representa a média das massas (g) dos grupos. A análise estatística não demonstrou efeito significativo do estresse ou do tratamento com VCD sobre a massa corpórea dos animais 80 dias após o tratamento com VCD (**CTL80 s/ ECI**, $227,5 \pm 61$ g, $n=6$; **CTL80 c/ ECI**, 230 ± 52 g, $n=7$; **VCD80 s/ ECI**, $217,1 \pm 29$, $n=6$; **VCD80 c/ECI**, $227,6 \pm 30$, $n=8$).

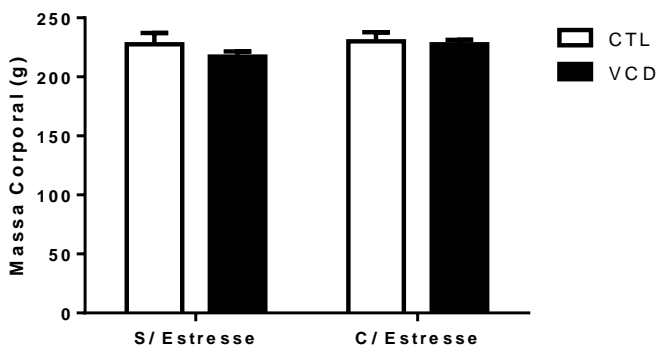


Figura 2. Massa corporal (g) dos animais estudados 80 dia após o início do tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos como média \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

Não houve efeito significativo de nenhum dos fatores, estresse ou tratamento com VCD sobre o peso relativo dos ovários quando estes foram analisados 80 dias após o tratamento com VCD (Figura 3) (**CTL80 s/ ECI**, $0,027 \pm 0,015$ g, $n=6$; **CTL80 c/ ECI**, $0,026 \pm 0,017$ g, $n=7$; **VCD80 s/ ECI**, $0,028 \pm 0,016$, $n=6$; **VCD80 c/ECI**, $0,025 \pm 0,013$, $n=8$).

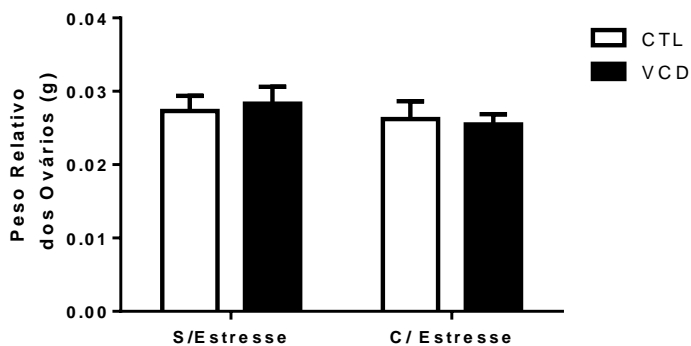


Figura 3. Peso relativo dos ovários dos animais estudados aos 80 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos como média \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

5.1.2 Ciclicidade Estral

A figura 4 mostra o ciclo estral dos animais do grupo CTL 80 sem exposição ao ECI, onde 100% dos animais permaneceram ciclando de maneira regular durante o período avaliado.

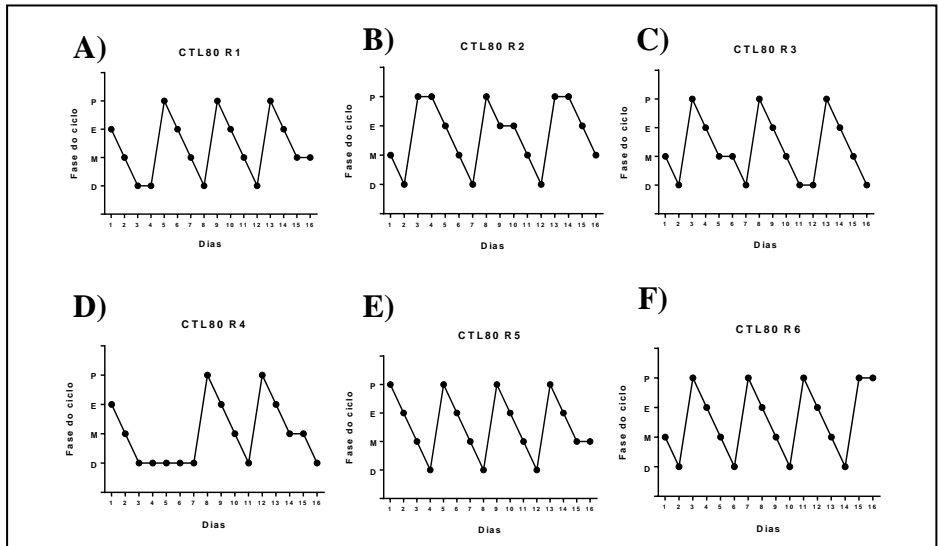


Figura 4. Ciclicidade do grupo controle 80 dias após a administração de veículo (óleo de milho), não exposto ao protocolo de ECI.

Na figura 5, quando avaliado o grupo CTL c/ECI 80 observou-se que o estresse desregulou a ciclicidade das ratas, já que quase 1/3 dos animais apresentaram ciclo irregular no período analisado (Fig. 4B, C e F).

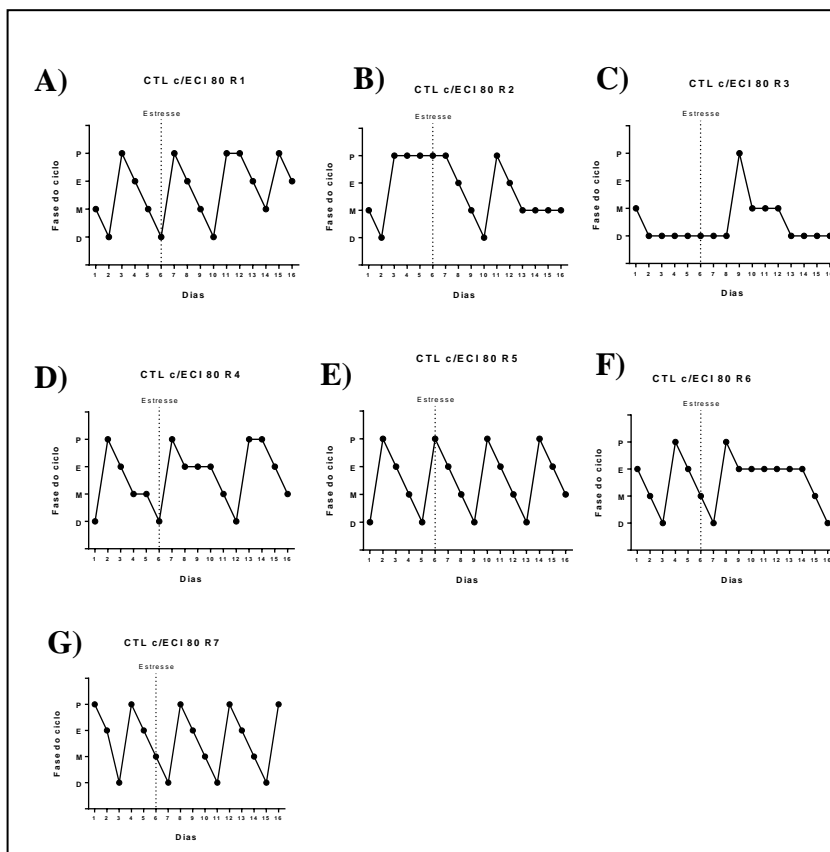


Figura 5. Ciclicidade do grupo controle 80 dias após a indução de óleo de milho, exposto ao protocolo de ECI.

A figura 6 mostra que no grupo experimental VCD 80 não submetido ao ECI, 1/3 dos animais (Fig. 5 C, F) não apresenta ciclicidade regular, o que sugere que a falha ovariana induzida pelo VCD pode interferir no ciclo estral.

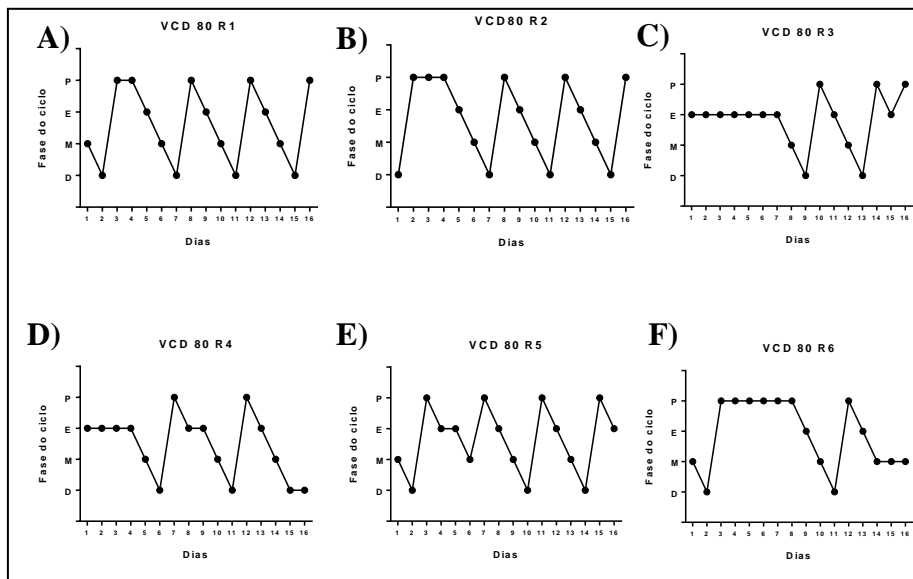


Figura 6. Ciclicidade do grupo VCD 80 dias após a indução de VCD, não exposto ao protocolo de ECI.

Na figura 7 observa-se que no grupo VCD 80 com exposição ao ECI 1/3 dos animais avaliados não ciclaram regularmente (Fig. 6 A, B e G), mostrando que o estresse não exacerbou os efeitos da falha ovariana na ciclicidade destes animais.

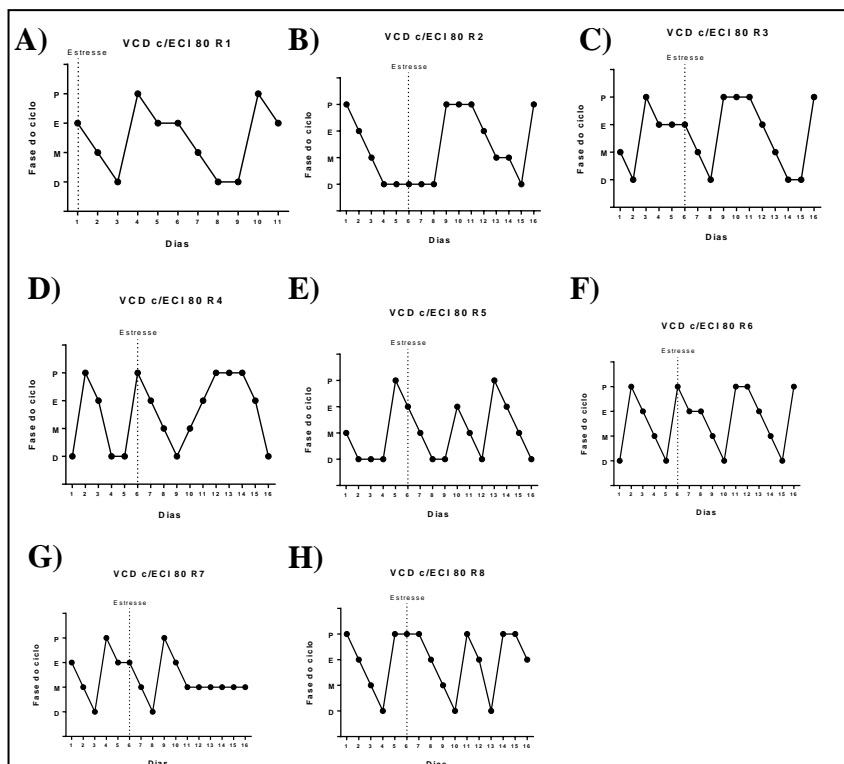


Figura 7. Ciclicidade do grupo VCD 80 dias após a indução de VCD, exposto ao protocolo de ECI.

5.1.3 Morfologia ovariana

A figura 8 exibe a quantificação dos FPs existentes em cada grupo experimental tratado com óleo de milho ou VCD, estressado ou não após 80 dias. Os resultados mostram que o VCD teve efeito significativo, como esperado, reduzindo a quantidade de FP ($P = 0,0011$; $F = 13,71$) (CTL80 s/ ECI, $n = 8$; CTL80 c/ ECI, $n = 7$; VCD80 s/ ECI, $n = 6$; VCD80 c/ ECI, $n = 8$,

$p<0,01$). Não houve efeito do estresse e nem interação significativa entre os fatores.

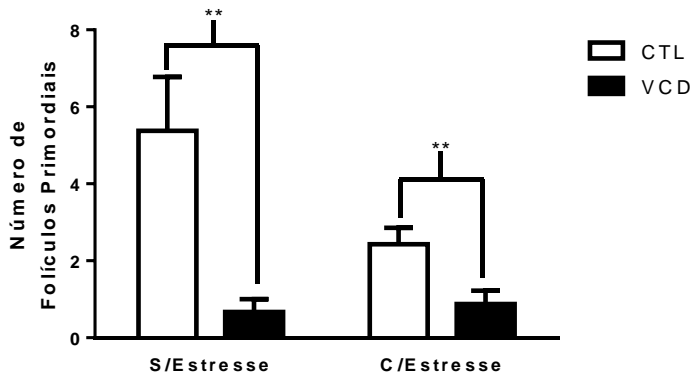


Figura 8. Quantificação de folículos primordiais e primários dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com o número total de FP de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p<0,01$.

A figura 9 mostra a morfologia ovariana de uma rata do grupo CTL 80 dias sem a indução ao ECI, onde destaca-se um FP.

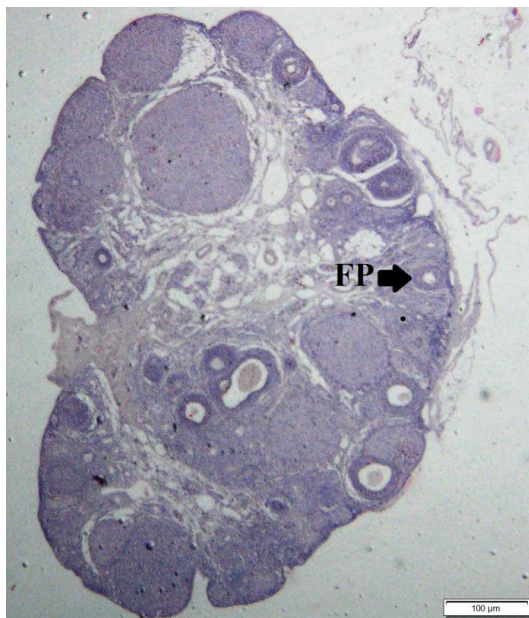


Figura 9. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL sem a indução ao ECI. A flecha aponta um folículo primordial. Escala 100 μ m, microscópio óptico, objetiva de 4 x.

Na figura 10, obteve-se interação entre os fatores estresse e tratamento com VCD ($P= 0,0193$; $F= 6,254$), onde nota-se que quando estressadas, somente as fêmeas do grupo CTL apresentam aumento no número de FA. Contudo, os grupos expostos ao ECI, apenas as ratas tratadas com VCD apresentam redução do número de FA (CTL80 s/ ECI, $n=8$; CTL80 c/ ECI, $n=7$; VCD80 s/ ECI, $n=6$; VCD80 c/ECI, $n=8$).

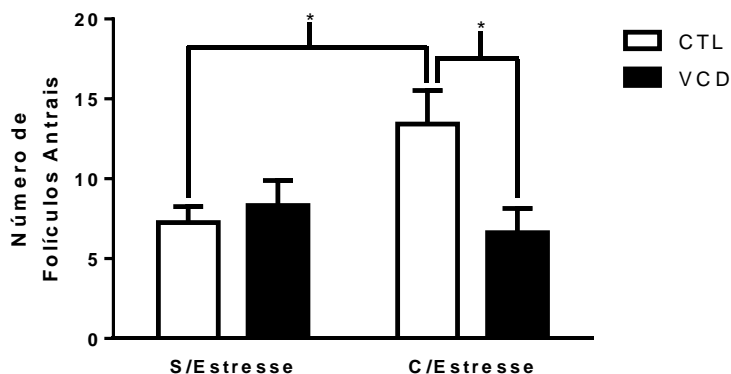


Figura 10. Quantificação de folículos antrais dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com o número total de FA de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

A figura 11 corresponde a morfologia ovariana de uma rata do grupo CTL não submetida ao protocolo de ECI, onde está acentuada a presença de FA.

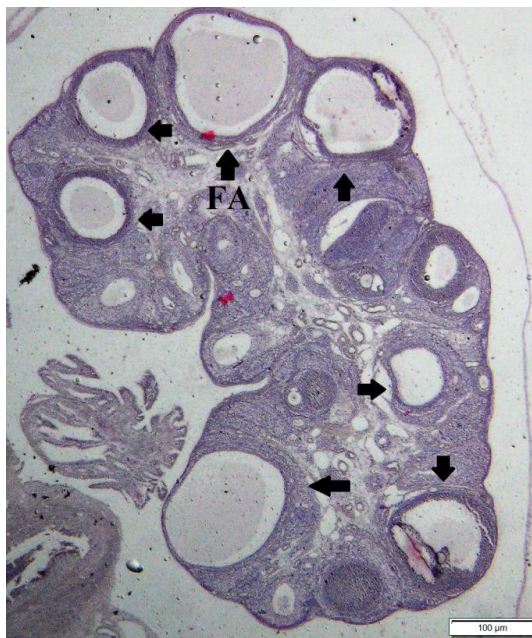


Figura 11. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL sem a indução ao ECI. As flechas mostram folículos antrais. Escala 100 µm, microscópio óptico, objetiva de 4 x.

A quantificação dos CLs mostrou que houve interação ($P= 0,0124$; $F= 7,257$) entre os fatores. A figura 12 mostra que o grupo tratado com VCD quando submetidos ao ECI aumentam o número de CLs. Estes mesmos animais, expostos ao ECI e tratados com VCD, tem um aumento do número de CLs quando comparados ao seu grupo CTL (CTL80 s/ ECI, $n=8$; CTL80 c/ ECI, $n=7$; VCD80 s/ ECI, $n=6$; VCD80 c/ECI, $n=8$, $p<0,05$).

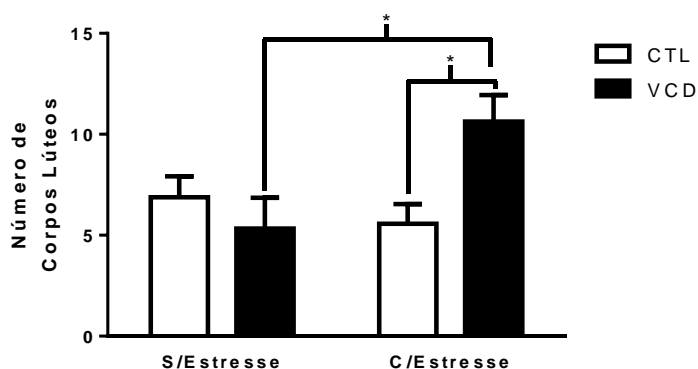


Figura 12. Quantificação de corpos lúteos em ratas 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com o número total de CL de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

A figura 13 representa a morfologia ovariana de uma rata do grupo VCD exposta ao protocolo de ECI, onde as flechas apontam CL.

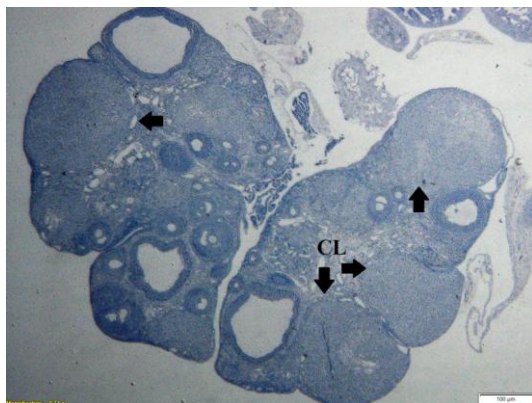


Figura 13. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL com a indução ao ECI. As flechas apontam corpos lúteos. Escala 100 μ m, microscópio óptico, objetiva de 4 x.

A figura 14 mostra que houve efeito significativo do tratamento com VCD ($P= 0,0333$; $F= 5,075$) e do estresse ($P= <0,0001$; $F= 39,95$), ou seja, o VCD aumentou o número de C e essa resposta foi exacerbada nos grupos estressados (**CTL80 s/ ECI**, $n=8$; **CTL80 c/ ECI**, $n=7$; **VCD80 s/ ECI**, $n=6$; **VCD80 c/ECI**, $n=8$).

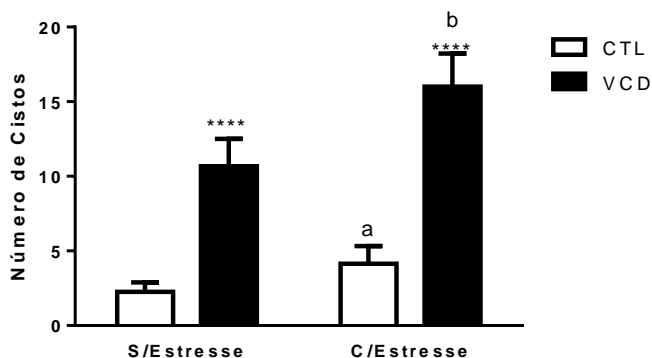


Figura 14. Quantificação de cistos em ratas estudadas 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com o número total de C de cada rata \pm dpm., **** efeito do VCD($P < 0,0001$), a efeito do estresse nas CTL ($P < 0,05$), b efeito do estresse na

A figura 15 mostra a morfologia ovariana de uma rata do grupo VCD submetida ao protocolo de ECI, onde as flechas apontam a presença de cistos.

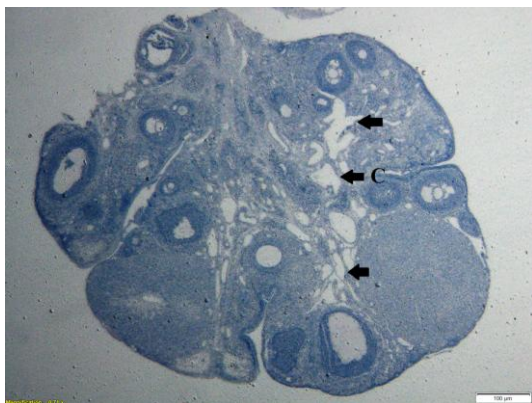


Figura 15. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL com a indução ao ECI, encontra-se destacado C. Escala 100 μ m, microscópio óptico, objetiva de 4 x.

A quantificação de FS mostra efeito significativo do tratamento com VCD ($P=0,0015$; $F=12,67$), havendo a diminuição destes folículos nos grupos tratados com esta droga (Figura 16) (CTL80 s/ ECI, $n=8$; CTL80 c/ ECI, $n=7$; VCD80 s/ ECI, $n=6$; VCD80 c/ECI, $n=8$).

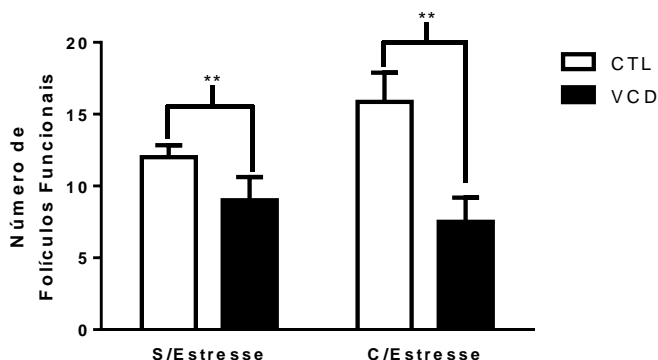


Figura 16. Quantificação de folículos funcionais dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com o número total de FS de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,01$.

5.1.4 Dosagem hormonal

A figura 17 mostra a dosagem de estradiol em animais que foram tratados ou não com VCD e expostos ou não ao protocolo de ECI. Neste dado não obtivemos interação ou efeito dos fatores estresse e tratamento com VCD (Dados já apresentados na dissertação de mestrado de Flaviano Lorenzon, ainda não publicados).

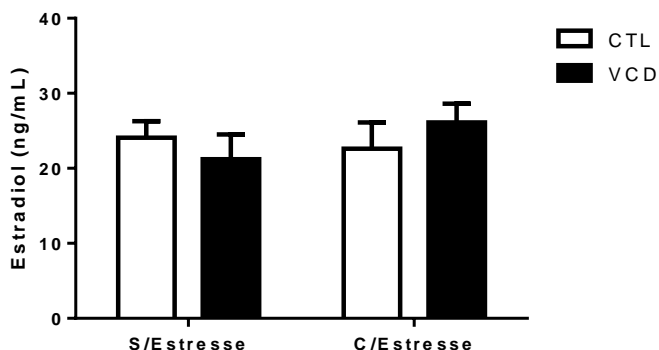


Figura 17. Dosagem de estradiol dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com a quantidade (ng/ml) de estradiol de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

A figura 18 exhibe a dosagem de progesterona nos grupos dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD. Neste resultado não tivemos interação ou efeito dos fatores estresse e tratamento com VCD (Dados já apresentados na dissertação de mestrado de Flaviano Lorenzon, não publicados).

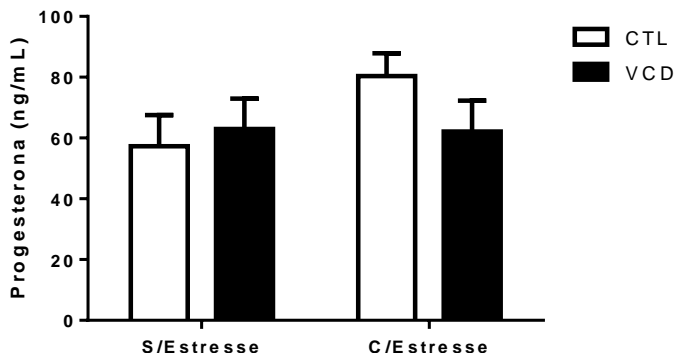


Figura 18. Dosagem de progesterona (ng/mL) dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com a quantidade (ng/ml) de progesterona de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

5.2 Animais estudados 180 dias após a administração de VCD ou óleo (menopausa)

5.2.1 Massa corporal e peso relativo dos ovários

A figura 19 apresenta a média da massa corporal (g) dos grupos. A análise estatística revelou que houve efeito significativo do estresse ($P=0,0054$; $F= 8,467$), onde os animais submetidos ao protocolo de ECI apresentaram-se com peso menor (**CTL180 s/ ECI**, $264,7 \pm 81$ g, $n=13$; **CTL180 c/ ECI**, $257,2 \pm 86$ g, $n=16$; **VCD180 s/ ECI**, $285,6 \pm 70$ g, $n=12$; **VCD180 c/ECI**, $252,3 \pm 119$ g, $n=12$).

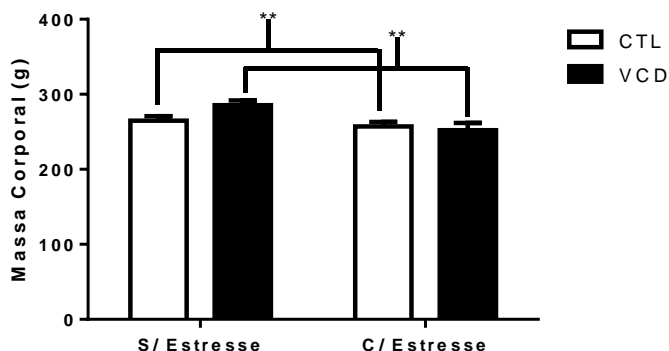


Figura 19. Massa corporal (g) dos animais estudados 180 dia após o início do tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos como média \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,01$.

Os ovários foram pesados individualmente, e seu peso relativo foi calculado. A análise estatística (Figura 20) mostrou que o tratamento com VCD teve efeito significativo ($P = 0,0174$; $F = 6,063$), reduzindo o peso relativo dos ovários (**CTL180 s/ ECI**, $0,018 \pm 0,021$ g, $n = 13$; **CTL180 c/ ECI**, $0,017 \pm 0,029$ g, $n = 16$; **VCD180 s/ ECI**, $0,014 \pm 0,007$, $n = 12$; **VCD180 c/ ECI**, $0,014 \pm 0,016$, $n = 12$).

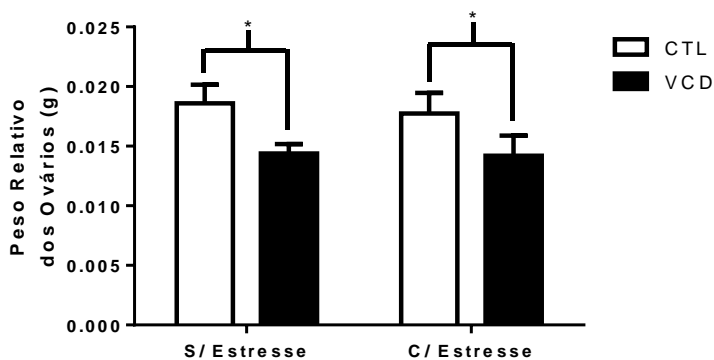


Figura 20. Peso relativo dos ovários dos animais estudados aos 180 dias após o início do tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos como média \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

5.2.2 Ciclicidade Estral

No grupo CTL 180 não submetido ao ECI, 1/3 das ratas apresentou um ciclo irregular (Fig. 18 C, D, G e I) (Fig. 21).

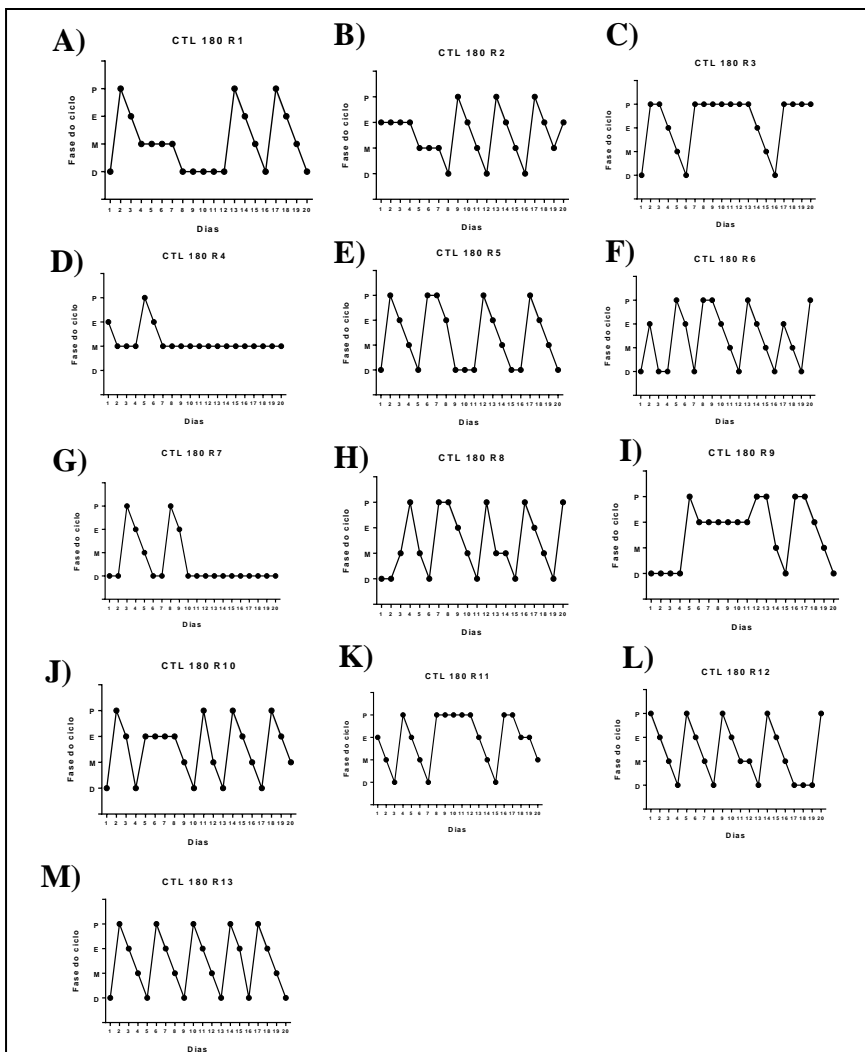


Figura 21. Ciclicidade do grupo CTL 180 dias após a indução de óleo de milho, não exposto ao protocolo de ECI.

Na figura 22 nota-se que aproximadamente metade dos animais do grupo CTL 180 com exposição ao ECI apresentou ciclicidade irregular (Fig. 19C, D, E, G, H, K e N).

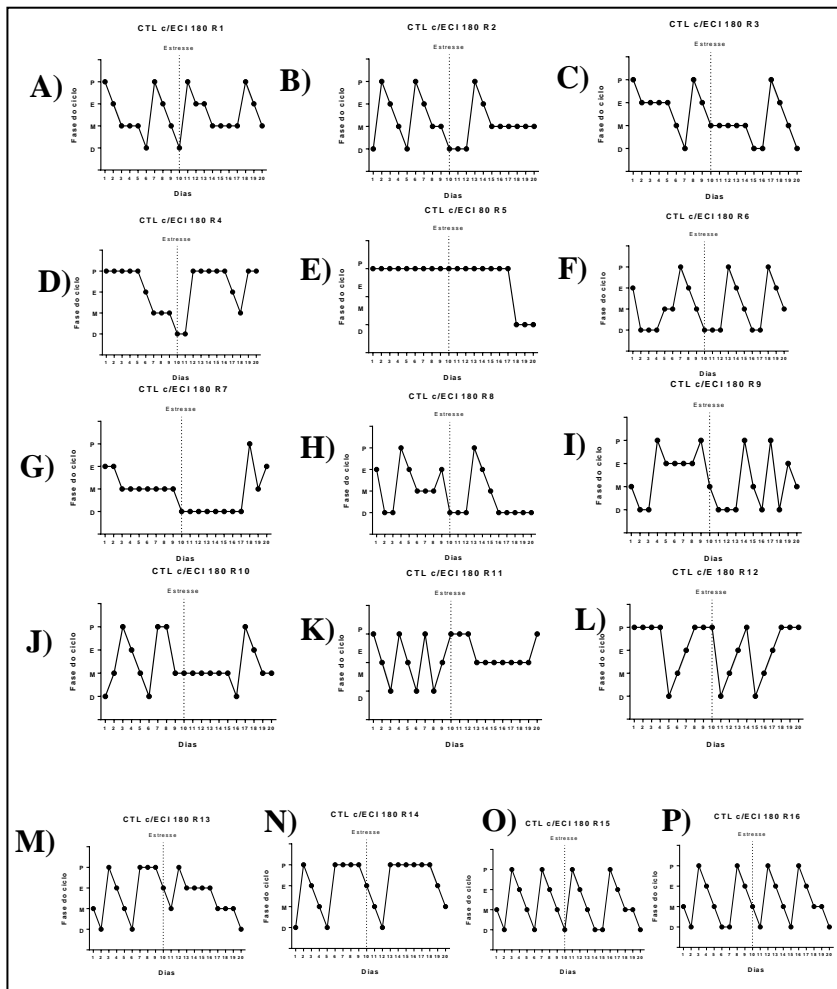


Figura 22. Ciclicidade do grupo CTL 180 dias após a indução de óleo de milho, exposto ao protocolo de ECI

Nas ratas do grupo VCD 180 sem exposição ao ECI, 1/3 dos animais não ciclaram ou pararam de ciclar regularmente no decorrer das averiguações (Fig. 23 B, E, I, K e L).

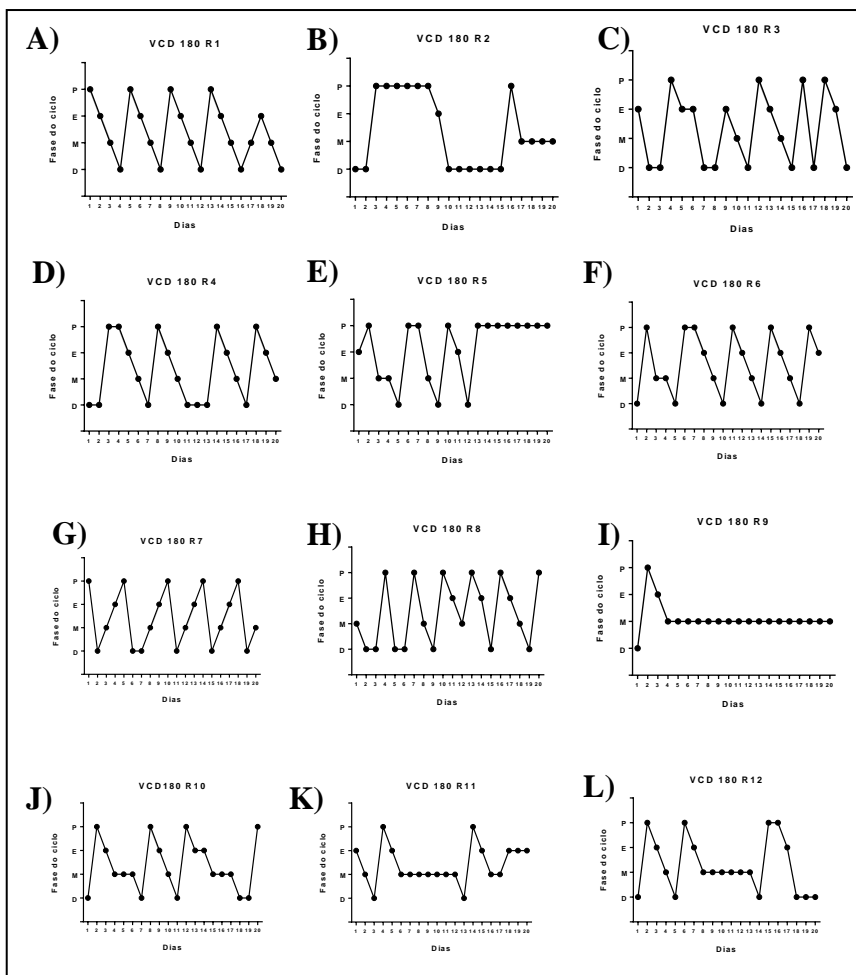


Figura 23. Ciclicidade do grupo VCD 180 dias após a indução do VCD, não exposto ao protocolo de ECI.

Quando os animais do grupo VCD 180 foram expostos ao ECI, metade das ratas apresentaram ciclicidade irregular (Fig. 24B, C, D, G, H e I).

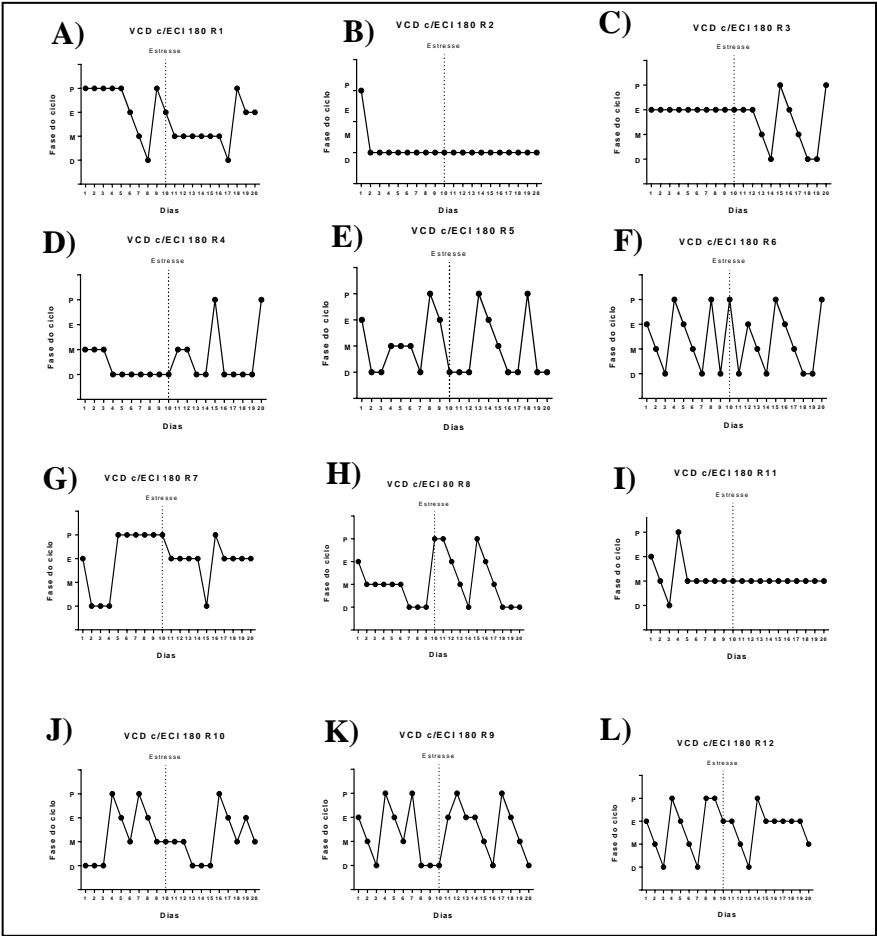


Figura 24. Ciclicidade do grupo VCD 180 dias após a indução de VCD, exposto ao protocolo de ECI.

5.2.3 Morfologia Ovariana

A figura 25 exibe a quantidade de FP existentes em cada grupo tratado com óleo de milho ou VCD, estressado ou não após 180 dias. Não houve efeito significativo de nenhum dos fatores analisados (CTL180 s/ ECI, n=8; CTL180 c/ ECI, n=6; VCD180 s/ ECI, n=7; VCD180 c/ECI, n=7).

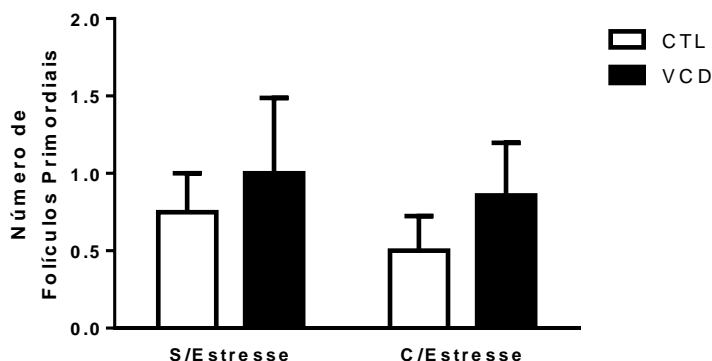


Figura 25. Quantificação de folículos primordiais dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com o número total de FP de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

A figura 26 mostra a morfologia ovariana de uma rata do grupo CTL 180 dias sem a indução ao ECI, onde está destacado um folículo primordial.

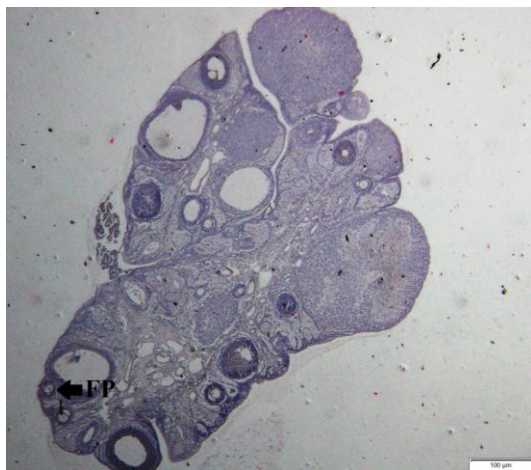


Figura 26. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL sem a indução ao ECI, encontra-se destacado FP. Escala 100 μm , microscópio óptico, objetiva de 4 x.

A figura 27 exhibe a quantificação de FA existentes em cada grupo tratado com óleo de milho ou VCD, estressado ou não após 180 dias. Não houve efeito dos fatores estudados ou interação entre (**CTL180 s/ ECI**, n=8; **CTL180 c/ ECI**, n=6; **VCD180 s/ ECI**, n=7; **VCD180 c/ECI**, n=7).

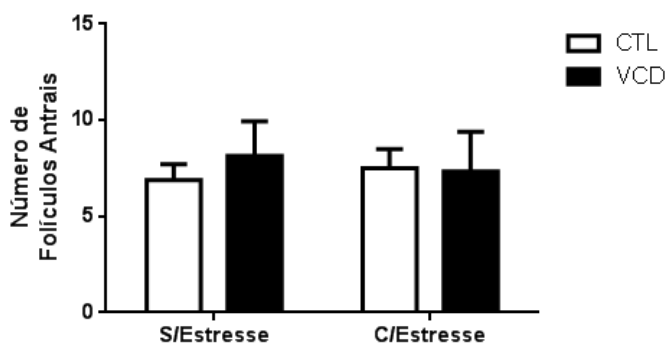


Figura 27. Quantificação de folículos antrais dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com o número total de FP de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

Na figura 28 está destacado um FA de uma rata de 180 dias, tratada VCD e submetida ao protocolo de ECI. Ao centro do FA é possível observar a presença do ovócito.

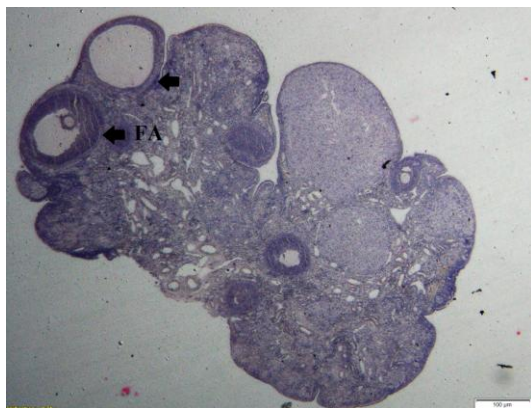


Figura 28. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo VCD com a indução ao ECI, encontra-se destacado FA. Escala 100 µm, microscópio óptico, objetiva de 4 x.

A figura 29 exhibe a quantificação de CLs presentes em cada grupo tratado com óleo de milho ou VCD, estressado ou não após 180 dias. Houve efeito significativo do fator tratamento com VCD ($P= 0,0370$; $F= 4,876$), (**CTL180 s/ ECI**, $n=8$; **CTL180 c/ ECI**, $n=6$; **VCD180 s/ ECI**, $n=7$; **VCD180 c/ECI**, $n=7$).

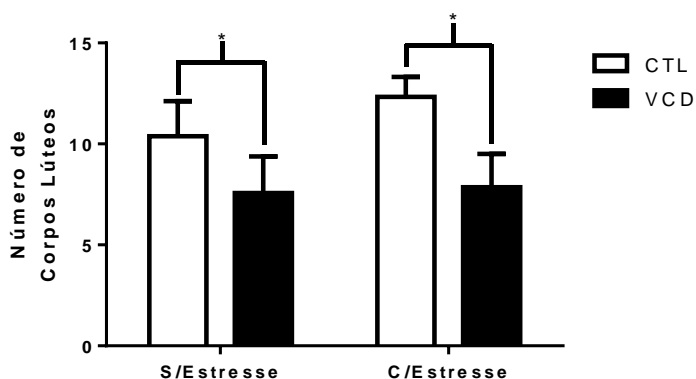


Figura 29. Quantificação de corpo lúteo dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com o número total de CL de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

Na figura 30 está destacado um CL de uma rata de 180 dias, tratada VCD e submetida ao protocolo de ECI. Ao centro do FA é possível observar a presença do ovócito.

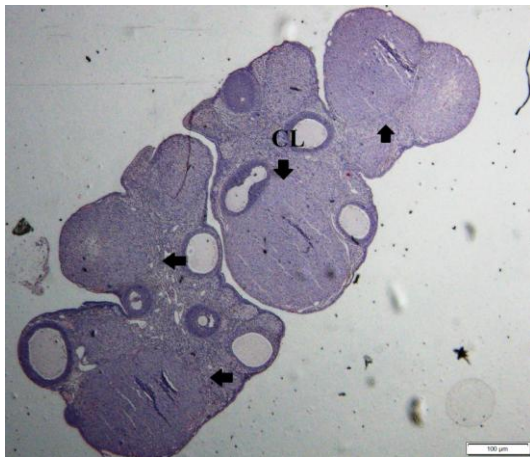


Figura 30. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL sem a indução ao ECI, encontra-se destacado CL. Escala 100 µm microscópio óptico, objetiva de 4 x.

A figura 31 exibe a quantificação de cistos presentes em cada grupo tratado com óleo de milho ou VCD, estressado ou não após 180 dias. Não houve efeito dos fatores ou interação entre eles (**CTL180 s/ ECI**, n=8; **CTL180 c/ ECI**, n=6; **VCD180 s/ ECI**, n=7; **VCD180 c/ECI**, n=7).

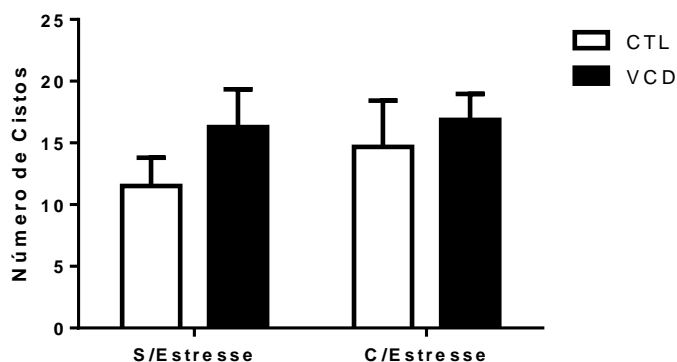


Figura 31. Quantificação de cistos dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com o número total de C de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

Na figura 32 está destacado cistos de uma rata de 180 dias, tratada com óleo de milho e não exposta ao protocolo de ECI.

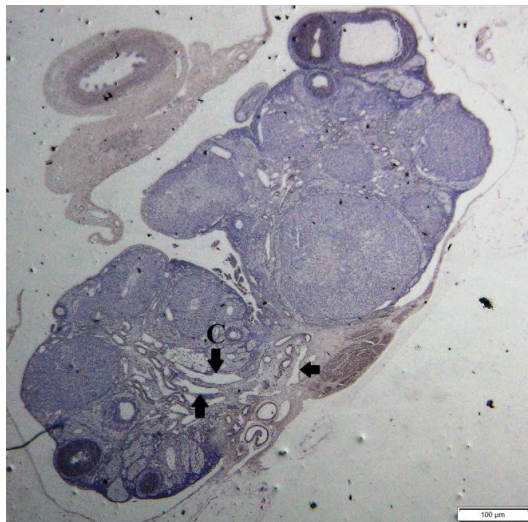


Figura 32. Fotomicrografia de luz de ovário de rata do grupo CTL sem a indução ao ECI, encontra-se destacado C. Escala 100 µm, microscópio óptico, objetiva de 4 x.

A figura 33 mostra a quantificação de FSs, ou seja, a soma dos FP e FA de cada animal, presentes em cada grupo tratado com óleo de milho ou VCD, estressado ou não após 180 dias. Com a análise dos dados, não houve efeito dos fatores analisados ou interação entre eles (**CTL180 s/ ECI**, n=8; **CTL180 c/ ECI**, n=6; **VCD180 s/ ECI**, n=7; **VCD180 c/ECI**, n=7).

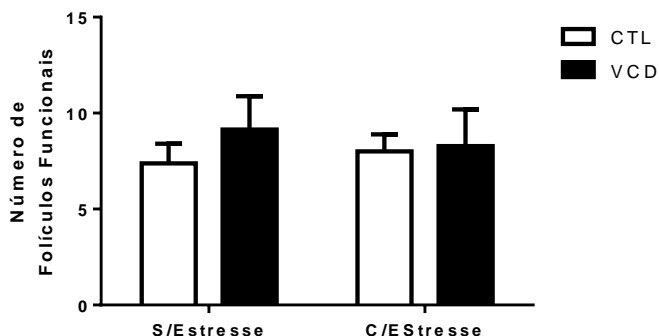


Figura 33. Quantificação de folículos funcionais dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com o número total de FS de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

5.2.4 Dosagem Hormonal

A figura 34 mostra a dosagem de estradiol dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo, expostos ou não ao protocolo de ECI. Houve interação significativa ($P=0,0320$; $F=5,114$) entre os fatores analisados, onde o grupo CTL quando exposto ao ECI teve um aumento dos níveis de estradiol quando comparado ao grupo CTL não estressados.

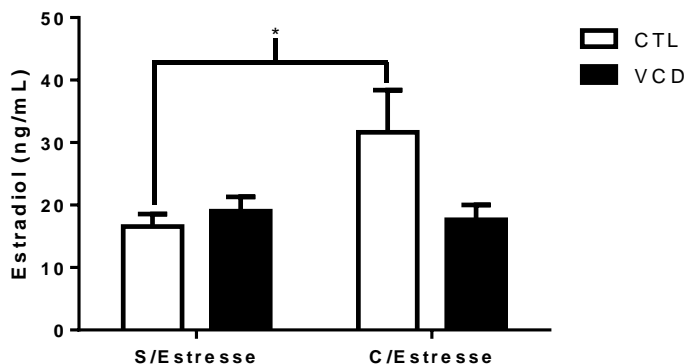


Figura 34. Dosagem de estradiol dos animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com a quantidade (ng/ml) de estradiol de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

A figura 35 apresenta a dosagem de progesterona, onde nota-se que houve efeito significativo do tratamento com VCD ($P=0,0028$; $F=9,976$). Os animais que foram tratados com este composto, sendo expostos ou não ao protocolo de ECI, apresentaram uma queda na concentração deste hormônio (Dados apresentados na dissertação de mestrado de Flaviano Lorenzon, ainda não publicados).

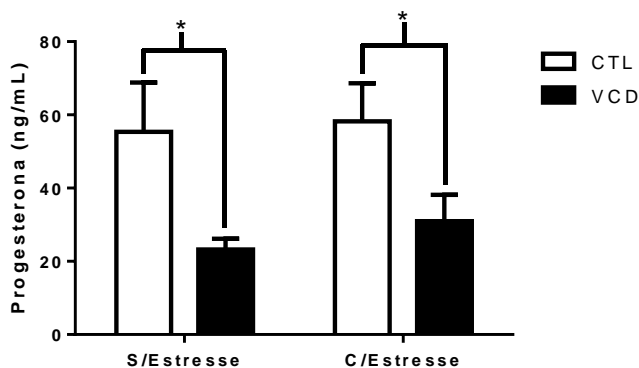


Figura 35. Dosagem de progesterona dos animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD ou óleo. Valores expressos com a quantidade (ng/ml) de progesterona de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

5.3 Resultados da Interação do Envelhecimento e Estresse na Morfologia Ovariana

A figura 36 mostra a diminuição significativa do número de FP de ratas de 180 dias comparadas com as de 80 dias, tratadas com óleo de milho, mostrando que o fator idade ($P = 0,0006$; $F = 15,65$) teve efeito significativo sobre a expressão destes folículos nos ovários. (CTL80 s/ ECI, $n = 8$; CTL80 c/ ECI, $n = 7$; CTL180 s/ ECI, $n = 8$; CTL180 c/ ECI, $n = 6$, $p < 0,001$).

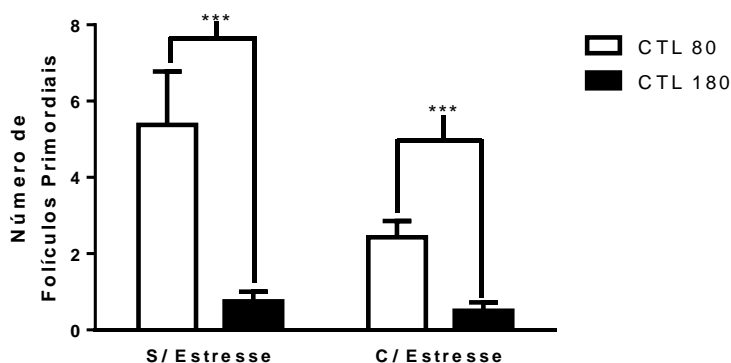


Figura 36. Quantificação de folículos primordiais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com óleo, expostos e não ao protocolo de ECI. Valores expressos com o número total de FP de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,001$

Na figura 37, apresentam-se as ratas do grupo VCD expostas ou não ao protocolo de ECI, onde não houve interação entre os fatores estudados e nem efeito dos fatores idade ou estresse no número de folículos primordiais (**VCD80 s/ ECI**, $n=6$; **VCD80 c/ECI**, $n=8$; (**VCD180 s/ ECI**, $n=7$; **VCD180 c/ECI**, $n=7$).

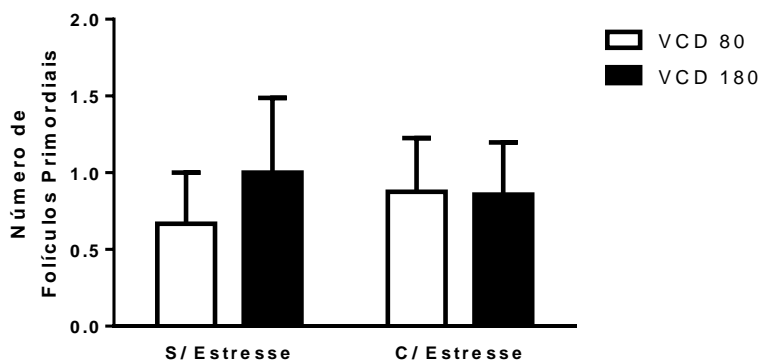


Figura 37. Quantificação de folículos primordiais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com VCD, expostos e não ao protocolo de ECI. Valores expressos com o número total de FP de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

Na figura 38, observam-se os dados obtidos na quantificação de FA de ratas que foram tratadas com óleo expostas ou não ao protocolo de ECI. Os resultados mostraram que houve efeito significativo da idade ($P=0,0249$; $F=5,698$) e do estresse ($P=0,0163$; $F=6,638$), bem como interação entre estes fatores ($P=0,0457$; $F=4,423$). As ratas de 80 dias que foram submetidas ao estresse apresentaram um aumento no número dos FA quando comparadas as não estressadas. No entanto, ratas com 180 dias pós-tratamento apresentam redução do número de FA quando estressadas se comparadas às de 80 dias.

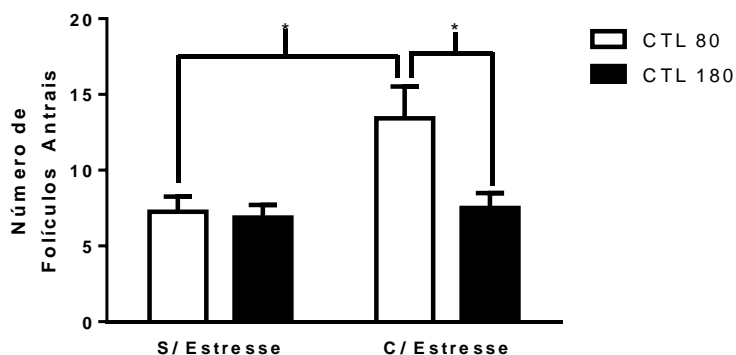


Figura 38. Quantificação de folículos antrais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com óleo de milho, expostos e não ao protocolo de ECI. Valores expressos com o número total de FA de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

Quando analisamos a figura 39, observa-se que não houve interação e nem efeito significativo dos fatores estudados neste trabalho com relação ao número de FAs nas ratas VCD (**VCD80 s/ ECI**, $n=6$; **VCD80 c/ECI**, $n=8$; (**VCD180 s/ ECI**, $n=7$; **VCD180 c/ECI**, $n=7$).

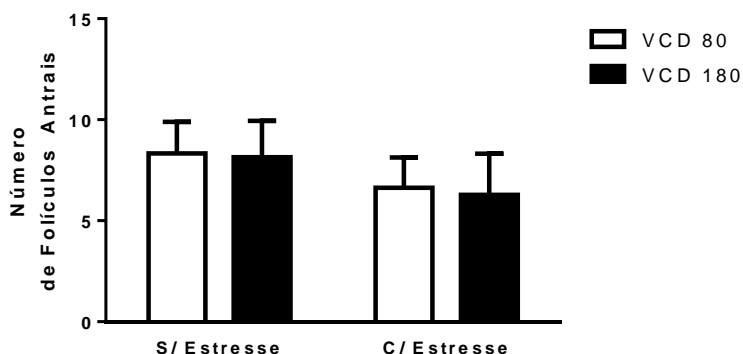


Figura 39. Quantificação de folicúlos antrais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com VCD, expostos e não ao protocolo de ECI. Valores expressos com o número total de FA de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

A figura 40 mostra que houve interação significativa entre os fatores estresse e idade ($P=0,0005$; $F=15,69$), nas ratas que foram tratadas com óleo de milho, tendo em vista que houve um aumento significativo do número de CLs somente nas ratas de 180 dias após estressadas. (**CTL80 s/ ECI**, $n=8$; **CTL80 c/ ECI**, $n=7$; **CTL180 s/ ECI**, $n=8$; **CTL180 c/ ECI**, $n=6$, $p < 0,0001$).

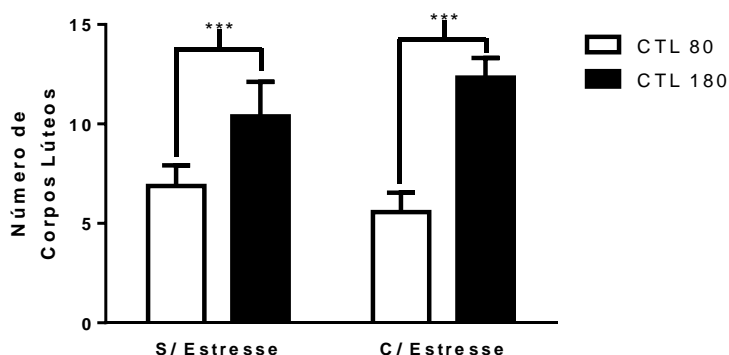


Figura 40. Quantificação de corpo lúteo dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com óleo de milho, expostos e não ao protocolo de ECI. Valores expressos com o número total de CL de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,001$.

Quando analisamos a figura 41 observa-se que não houve efeito significativo de nenhum dos fatores ou interação entre eles nas ratas tratadas com VCD no número de CLs (**VCD80 s/ ECI**, $n=6$; **VCD80 c/ECI**, $n=8$; (**VCD180 s/ ECI**, $n=7$; **VCD180 c/ECI**, $n=7$, $p < 0,001$).

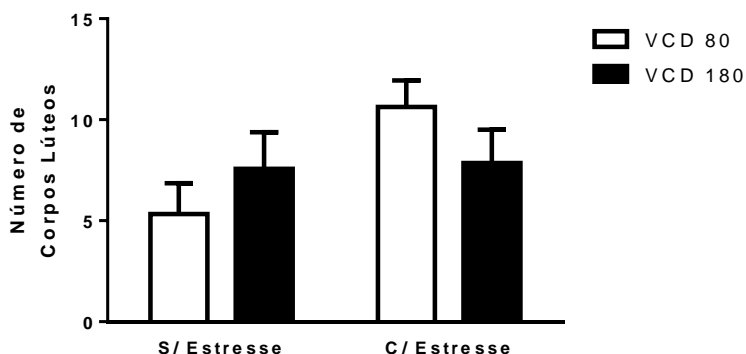


Figura 41. Quantificação dose corpos lúteos dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com VCD, expostos e não ao protocolo de ECI. Valores expressos com o número total de CL de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

A figura 42 mostra um efeito significativo do fator idade ($P=0,0001$; $F=21,68$) em ratas do grupo CTL, já que houve aumento do número de cistos apenas naquelas com 180 dias pós-tratamento com óleo placebo, independentemente de terem sido submetidas ao estresse (**CTL80 s/ ECI**, $n=8$; **CTL80 c/ ECI**, $n=7$; **CTL180 s/ ECI**, $n=8$; **CTL180 c/ ECI**, $n=6$, $p < 0,05$).

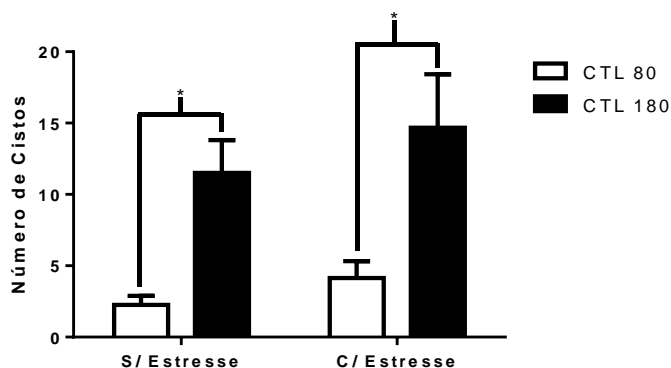


Figura 42. Quantificação de cistos dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com óleo de milho, expostos e não ao protocolo de ECI. Valores expressos com o número total de C de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

Quando foi analisada a figura 43, notamos que não houve efeito significativo de nenhum dos fatores ou interação entre eles em ratas que foram tratadas com VCD, sendo expostas ou não ao protocolo de ECI. (**VCD80 s/ ECI**, $n=6$; **VCD80 c/ECI**, $n=8$; (**VCD180 s/ ECI**, $n=7$; **VCD180 c/ECI**, $n=7$).

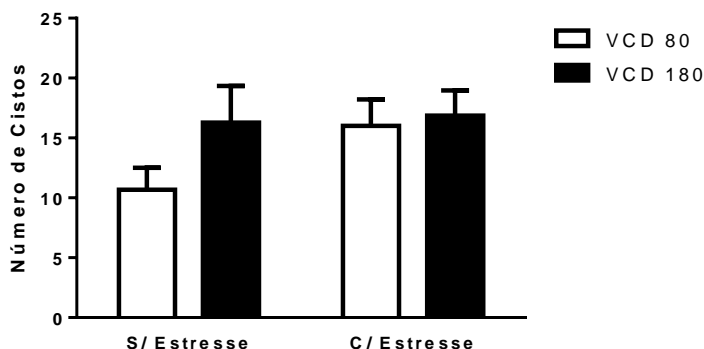


Figura 43. Quantificação de cistos dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com VCD, expostos e não ao protocolo de ECI. Valores expressos com o número total de C de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

Na figura 44 notamos que houve interação significativa entre os fatores idade ($P=0,0001$; $F=23,30$) nos animais que foram tratados com óleo e submetidos ao protocolo de ECI, pois com o envelhecimento o número de FF diminuiu apenas no grupo estressado (**CTL80 s/ ECI**, $n=8$; **CTL80 c/ ECI**, $n=7$; **CTL180 s/ ECI**, $n=8$; **CTL180 c/ ECI**, $n=6$).

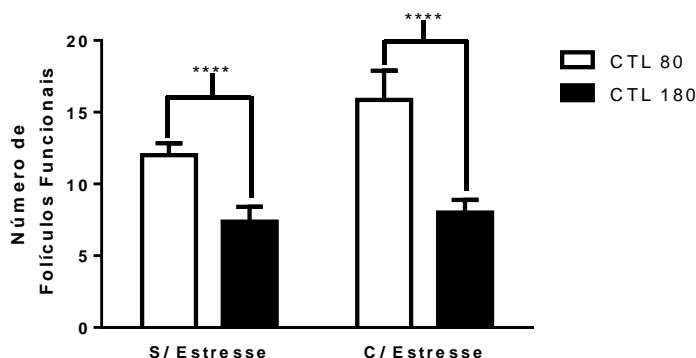


Figura 44. Quantificação de folículos funcionais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com óleo de milho, expostos e não ao protocolo de ECI. Valores expressos com o número total de FS de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,0001$.

Na figura 45, observa-se que não houve efeito significativo de nenhum dos fatores ou interação entre eles nos animais tratados com VCD e expostos ou não ao protocolo de ECI no número de FF (**VCD80 s/ ECI**, $n=6$; **VCD80 c/ECI**, $n=8$; (**VCD180 s/ ECI**, $n=7$; **VCD180 c/ECI**, $n=7$).

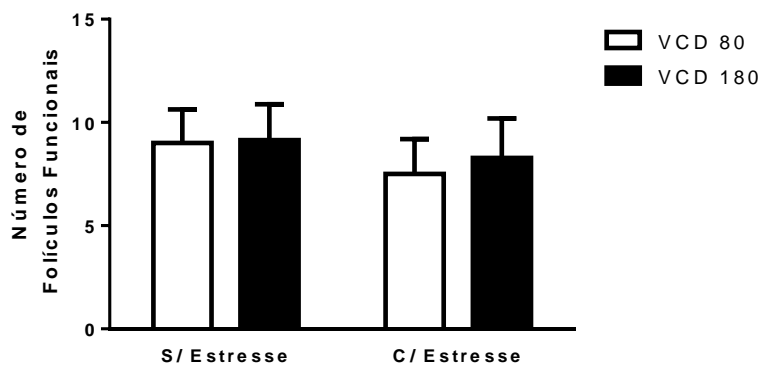


Figura 45. Quantificação de folículos funcionais dos animais estudados 80 e 180 dias após o tratamento com VCD, expostos e não ao protocolo de ECI. Valores expressos com o número total de FS de cada rata \pm dpm. Two way ANOVA, $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

6.1 Animais estudados 80 dias após o tratamento com VCD

6.1.1 Ciclicidade Estral

O estresse tem sido destacado como um fator desencadeante de alterações na função reprodutiva (Moreira, 2006). Nossos resultados corroboram este dado a ainda mostram que o efeito do estresse sobre a regularidade do ciclo estral não foi exacerbado nas ratas tratadas com VCD, pelo menos 80 dias após a indução da falha ovariana. Sabe-se que nesta fase de 80 dias pós-tratamento as variações dos hormônios gonadais são semelhantes àquelas que acontecem na perimenopausa humana. Dados da literatura mostram que os níveis séricos de estradiol ainda não estão em declínio neste período de 80 dias após o tratamento com VCD (Reis *et al.*, 2014). No entanto, os mesmos autores mostram alterações nas secreções de outros hormônios ovarianos neste período de 80 dias que são similares às alterações endócrinas vistas em mulheres na perimenopausa (Lukefahr *et al.*, 2012, Reis *et al.*, 2014), tais como redução das concentrações plasmáticas de progesterona, testosterona e dihidrotestosterona.

As reações neuroendócrinas decorrentes do estresse podem comprometer a função reprodutiva, sendo esses efeitos mediados por interferências dos hormônios relacionados ao estresse sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovariano (Urdampilleta & Fernandez, 1999). Reconhecidamente, estresses crônicos alteram a secreção normal de gonadotrofinas e desestabilizam a funcionalidade do eixo hipotálamo-hipófise-ovário culminando com o aparecimento de sérios quadros de anovulação crônica (Kaplan & Manuck, 2004; Kalantaridou, Makrigiannakis *et al.*, 2004; Genazzani, 2005). Apesar do estresse não ter exacerbado os efeitos do VCD sobre a ciclicidade, notamos que aproximadamente 1/3 das ratas VCD eram acíclicas, mesmo sem a exposição ao ECI. Enquanto alguns autores mostram que ratas tratadas com VCD continuam ciclando por até um ano (Mayer *et al.*, 2002), outros relatam que ocorre um alongamento dos ciclos, que podem chegar a até 12 dias (Lohff *et al.*, 2005). Este parece ser o caso no presente

estudo, no qual consideramos então que as ratas tornaram-se acíclicas, ou pelo menos incapazes de ciclar regularmente.

6.1.2 Morfologia Ovariana

As ratas tratadas com VCD não apresentaram perda de peso corporal ou do peso relativo dos ovários quando comparadas às controles, corroborando dados anteriores que mostram que o VCD não tem impacto significativo no ganho de peso corporal, mesmo por tempos mais prolongados que 80 dias após o tratamento (Battiston *et al.*, 2016). Além da ciclicidade irregular, as ratas tratadas com VCD também apresentaram MO diferente do que é esperado para fêmeas adultas jovens. As alterações na aparência morfológica folicular indicam processos degenerativos (Lucci *et al.*, 2004). Entretanto, os dados hormonais do presente estudo não mostraram efeito do tratamento com VCD e nem do estresse sobre as concentrações de E e P. Este dado não corrobora aquele encontrado por Reis, *et al.*, 2014, que mostraram uma redução dos níveis de P 80 dias após o tratamento com VCD.

Com relação aos folículos primordiais, notou-se o efeito esperado do VCD nas ratas não submetidas ao ECI, pois é conhecido que este fármaco causa a depleção deste tipo de folículo (Kao *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 2004; Springer *et al.*, 1996). Quando os animais foram submetidos ao ECI esta diferença entre ratas tratadas com VCD e ratas controle desapareceu, mostrando que o estresse teve um efeito prejudicial nos ovários diminuindo o número de folículos primordiais, inclusive nas ratas controles, ou seja, independentemente da administração do VCD. Quando analisamos os folículos antrais, as ratas do grupo CTL submetidas ao ECI apresentaram um aumento significativo no número destes folículos. De acordo com Bleil *et al.*, 2012, a exposição ao estresse eleva significativamente a habilidade reprodutiva de ratas jovens, mas não de meia idade, o que poderia explicar este aumento de folículos antrais nas ratas controles jovens do presente estudo. Entretanto, aquelas tratadas com VCD não apresentaram este aumento, sugerindo que a falha ovariana interferiu de alguma maneira nos mecanismos pelos quais o estresse poderia provocar esta melhora reprodutiva. A

análise da MO mostrou que as ratas tratadas com VCD e expostas ao ECI tiveram um aumento significativo no número de corpos lúteos, comparadas às controles. A administração de VCD não altera o número de corpos lúteos (Mayer *et al.*, 2002), no entanto, demonstramos aqui pela primeira vez que se estas ratas com falha ovariana foram expostas ao ECI, ocorre um aumento destas estruturas nos ovários. Duas hipóteses poderiam explicar este resultado: a exposição ao ECI eleva a atividade noradrenérgica direta nos ovários via receptores alfa-adrenérgicos, aumentando o fluxo sanguíneo ovariano (Kotwica, 1992). Esta alteração provocada por um estresse leve, ajudaria na função ovariana, protegendo principalmente o corpo lúteo. Contudo, a outra hipótese nos parece mais plausível. Sabe-se que as células do corpo lúteo apresentam receptores para glicocorticóides e que no momento da ovulação ocorre um aumento dos níveis de glicocorticóides intra-ovarianos (Whirledge & Cidlowski, 2010), o que parece fazer parte dos mecanismos de manutenção do corpo lúteo ao longo da fase lútea. Entretanto, níveis precisos destes hormônios são necessários para que este processo ocorra. O aumento de glicocorticóides devido à exposição ao ECI seria capaz de afetar negativamente a função ovariana, inclusive no que se refere à manutenção do corpo lúteo, que se afetada, poderia levar ao aumento do número de cistos provenientes dos mesmos. Esta hipótese corrobora nossos resultados, pois as ratas VCD expostas ou não ao ECI apresentaram um número significativamente maior de cistos ovarianos, sugerindo que pelo menos parte dos cistos encontrados nas VCD estressadas seja proveniente dos números aumentado de corpos lúteos.

Para verificação do número de folículos funcionais foi realizada a soma dos folículos primordiais e dos antrais. O tratamento com VCD associado à exposição ao ECI levou a uma diminuição significativa no número de folículos ovarianos saudáveis. Este resultado sugere que no período correspondente ao que seria a perimenopausa, as ratas tratadas com VCD já apresentam uma deterioração significativa de sua MO, que é

agravada pela exposição ao ECI, e afeta, conseqüentemente, a sua fisiologia reprodutiva.

Desta maneira, notamos que durante o período equivalente à perimenopausa obtivemos resultados interessantes que estão em acordo com as influências psicossociais, culturais e situacionais que influenciam a sexualidade (Favarato & Aldrighi, 2001). Isto pode abrir perspectivas para novas pesquisas, auxiliando mulheres que poderiam se beneficiar de terapias precoces nessa fase da vida, sejam elas de reposição hormonal ou outras alternativas.

6.2 Animais estudados 180 dias após o tratamento com VCD

6.2.1 Ciclicidade Estral

Quando verificamos a ciclicidade estral das ratas do grupo controle (óleo de milho), notamos que 1/3 das ratas tornou-se acíclica, indicando que o avanço da idade interferiu desfavoravelmente na ciclicidade estral. Nas ratas do grupo CTL e expostas ao protocolo de ECI, metade dos animais mostrou-se acíclica o que nos sugere que o estresse agravou os efeitos prejudiciais do avanço da idade sobre a regularidade dos ciclos estrais.

No grupo de ratas tratadas com VCD e não submetidas ao ECI, 1/3 dos animais demonstraram irregularidades no ciclo estral. Esta foi a proporção de ratas acíclicas encontradas no grupo estudado 80 dias após a administração do VCD, não submetidas ao ECI. Este resultado corrobora os de Lohff e colaboradores (2005), que mostraram que o tratamento com VCD leva à irregularidades no ciclo estral ao longo do tempo, principalmente por alongar os ciclos. Assim, os dados do presente estudo sugerem que nas ratas com falha ovariana precoce o avanço da idade, pelo menos de 80 para 180 dias, parece não exacerbar os efeitos do VCD de diminuir a regularidade da ciclicidade estral. Já quando as ratas foram submetidas ao tratamento com VCD e expostas ao protocolo de ECI, metade mostrou-se acíclica. Tendo em vista que 80 dias após o VCD apenas 1/3 das ratas expostas ao ECI manteve-se acíclico,

podemos sugerir que aos 180 dias pós-VCD houve um agravamento dos efeitos do VCD associado ao estresse, provavelmente devido ao processo de envelhecimento que acompanhou estas ratas.

6.2.2 Morfologia Ovariana

Quando comparamos o número de todas as estruturas ovarianas estudadas no presente trabalho (Folículos Primordiais, Folículos Antrais, Corpo Lúteo, Cistos e Folículos funcionais) aos 180 dias, entre as ratas controle e VCD, expostas ou não ao ECI, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma das análises. Em um primeiro momento isto poderia sugerir que o envelhecimento, já que o estresse e o tratamento com VCD não apresentaram efeitos sobre a MO desses animais. No entanto, se compararmos os animais em suas diferentes idades (80 e 180 dias pós-VCD) observa-se que há sim efeitos significantes, os quais não foram visíveis nas comparações entre controles *versus* tratadas com VCD porque aos 180 dias as ratas controles já apresentam queda no número da maioria das estruturas ovarianas aqui analisadas.

Quando analisamos os folículos primordiais das ratas controle não expostas ao ECI, comparando-as aos 80 e 180 dias após injeção de óleo de milho, observamos uma diminuição significativa do número destes folículos nas ratas de 180 dias. Este resultado aponta para um efeito significativo do envelhecimento *per si* em reduzir o número de folículos primordiais, mesmo na ausência de falha ovariana precoce causada pelo VCD. Por outro lado, comparando-se os grupos CTL 80 *versus* 180 dias, ambos submetidos ao procedimento de ECI, nota-se que esta diferença desaparece, provavelmente porque as ratas CTL 80 submetidas ao ECI já apresentavam um número reduzido de folículos primordiais, como resposta ovariana ao estresse.

Com relação aos folículos antrais, observou-se que as ratas controle, 80 dias após a administração de óleo, apresentaram um aumento significativo no número de destes folículos quando submetidas ao ECI. No entanto, o grupo CTL 180 pós-administração de óleo apresenta um número significativamente

menor de folículos antrais comparadas às CTL 80 dias. Desta forma, os dados sugerem que aquela possível melhora na habilidade reprodutiva causada pelo estresse em um primeiro momento, parece ser anulada pelo envelhecimento, independentemente de haver falha ovariana precoce.

A quantificação dos corpos lúteos em ratas CTL 80 e 180 dias pós-administração de óleo mostrou que ao serem submetidas ao ECI, as ratas CTL180 apresentam um aumento do número de destas estruturas em comparação às CTL 80. Se recapitularmos nossos resultados nas ratas VCD 80 dias veremos que as mesmas também apresentaram este aumento do número de corpos lúteos após exposição ao ECI. Assim, propomos que a falha ovariana levou a uma precocidade na resposta ovariana ao estresse, já que esta resposta de aumento do número de corpos lúteos ocorreu somente em uma idade mais avançada nas ratas sem falha ovariana. Sugerimos ainda que aos 180 dias pós-injeção de óleo, as ratas CTL ficam mais susceptíveis aos efeitos prejudiciais do estresse nos ovários em comparação com o período de 80 dias.

As ratas CTL 180 após injeção de óleo apresentaram um aumento do número de cistos ovarianos, independentemente de terem sido expostas ao ECI, indicando um efeito adverso do envelhecimento sobre a morfologia ovariana. Não podemos excluir a hipótese de que este aumento do número de cistos seja ainda resultado do aumento do número de corpos lúteos, os quais podem tornar-se cistos ao longo da fase lútea se houverem alterações nos mecanismos fisiológicos que provocam a luteólise. Sabe-se que os cistos podem se formar de diferentes maneiras, sendo um dos mais comuns àqueles chamados simples, os quais se formam quando a ovulação não ocorre ou quando o folículo maduro regride (Kondo W, *et al.*, 2011). No entanto, cistos podem também se formar a partir de corpos lúteos que começam a apresentar acúmulo de líquido e não entram no processo de luteólise. Estas alterações fazem com que estes entrem em processo de degeneração e mais tarde apresentem características histológicas de cistos (Borders *et al.*, 2004; Potter *et al.*, 2008). O número de folículos funcionais diminuiu nas ratas CTL 180 comparadas às CTL 80, apenas quando ambas foram expostas ao

ECI. Mais uma vez nossos resultados sugerem um efeito adverso do envelhecimento sobre a morfologia ovariana, o qual foi agravado pela exposição ao estresse.

Quando fazemos a mesma análise nas ratas tratadas com VCD, comparando-as 80 e 180 dias após tratamento, novamente não encontramos diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos parâmetros ovarianos avaliados. Nossa hipótese é que os possíveis efeitos do envelhecimento foram mascarados pelo fato das ratas com falha ovariana apresentarem precocemente aquelas alterações típicas do avanço da idade.

O avanço da idade está vinculado com o aumento do FSH, estimulando o recrutamento de folículos ovarianos. Este processo pode estar associado com o aumento de estradiol observado nas ratas de 180 dias do grupo CTL submetidas ao protocolo de ECI. Nossos dados sugerem o declínio dos hormônios ovarianos, em específico a progesterona, parece não ser o único responsável pela redução da habilidade reprodutiva em ratas. Apesar de ser um modelo experimental, este estudo abre novas perspectivas para pesquisas que relacionem, por exemplo, o tratamento de mulheres menopausadas não somente com reposição hormonal adequada, mas também associado a terapias alternativas que incluam mudanças no estilo de vida ou mesmo o uso de medicamentos que possam combater o estresse e a precocidade dos processos de envelhecimento. Tais medidas não evitariam a perda da habilidade reprodutiva com o envelhecimento, mas poderiam contribuir no sentido de postergar esta perda, ou ainda, com a melhora na sintomatologia associada à menopausa.

7. CONCLUSÃO

A associação do estresse com o processo de envelhecimento agrava ainda mais os efeitos prejudiciais da falha ovariana precoce induzida pelo VCD sobre a capacidade reprodutiva. A associação destes fatores leva a uma antecipação da perda da capacidade reprodutiva, principalmente por aumentar o número de cistos ovarianos e reduzir o número de folículos funcionais. Os dados sugerem, portanto, que no climatério, fatores como o estresse cotidiano e o próprio processo de envelhecimento devem ser levados em consideração não só como um mecanismo a ser utilizado em terapias de prevenção à instalação precoce da menopausa, mas também no tratamento de mulheres já com a menopausa instalada e seus sintomas adversos, no sentido de contribuir para melhorar sua qualidade de vida nesta fase.

8.BIBLIOGRAFIA

- ACOSTA, J. I. *et al.* Transitional versus surgical menopause in a rodent model: etiology of ovarian hormone loss impacts memory and the acetylcholine system. **Endocrinology**, v.150, p. 4248-59. 2009.
- AGUILERA, G. (1998). Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 9, n. 8, p. 329-336.
- AIRES, MARGARIDA DE MELLO *et. al.*, – **Fisiologia** 3^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 1. 1056 p.
- AKIL, H.A.; MORANO, M.I. STRESS. IN: BLOOM, F.E; KUPFER, D.J. (Eds.). (1995). **Psychopharmacology**: the fourth generation of progress. New York: Raven. p. 773-785.
- ALMELA,M., HIDALGO,V., VILLADA,C., ESPIN,L., GOMEZ-AMOR,J., AND SALVADOR,A. (2011). The impact of cortisol reactivity to acute stress on memory: sex differences in middle-aged people. **Stress**. 14, 117-127.
- BATTISTON FG¹, DOS SANTOS C¹, BARBOSA AM¹, SEHNEM S¹, LEONEL EC², TABOGA SR², ANSELMO-FRANCI JA³, LIMA FB¹, RAFACHO A⁴. Glucose homeostasis in rats treated with 4-vinylcyclohexene diepoxide is not worsened by dexamethasone treatment. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 2016 Jun 3.
- BERNUCI, M. P, C. M. LEITE, P. BARROS, B. KALIL, G. B. LEONI, B. DEL BIANCO- BORGES, C. R. FRANCI, R. E. SZAWKA, H. E. LARA AND J. A. ANSELMO-FRANCI (2013). Transitory Activation

of the Central and Ovarian Norepinephrine Systems During Cold Stress-Induced Polycystic Ovary in Rats v.25 p. 23-33.

BERNE, R. B, LEVY, M. N. **Tratado De Fisiologia Humana**. 4 Ed. Rj. Guanabara Koogan, 2000.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; RODGERS, J.; WEISS, S.M. (1990). The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neurosci. Biobehav.**, v. 14, p. 463-472.

BORDERS, R. J., BREIMAN, R. S., YEH, B. M. *et. al.*, Computed tomography of corpus luteal cysts. **J. Comput Assist Tomogr**. 2004; 28 (3): 340-2.

BRASIL FB, FARIA TS, SAMPAIO FJB, RAMOS CF: The Effect of Maternal Malnutrition During Lactation on the Endometrial ER α Expression, Collagen Type, and Blood Vessels in the Rats Offspring at Puberty. **The Anatomical Record**, 2010, 293(1): 162–170.

CALIGIONI, C., (2009). Assessing Reproductive Status/Stages in Mice, **Current Protocols in Neuroscience** v.35, p. 1-10.

CERESINI, G., FREDDI, M., MORGANTI, S., REBECCHI, I., MODENA, A.B., RINALDI, M., MANCA, C., AMADUCCI, A., DEL, R.G., AND VALENTI, G. (2000). The effects of transdermal estradiol on the response to mental stress in postmenopausal women: a randomized trial. **Am. J. Med.** 109, 463-468.

COELHO, T.H., ET. AL, (2002). Regulação do Tono Muscular, Porto, p.1-9.

- DAL-ZOTTO, S.; MARTI, O.; ARMARIO, A. (2000). Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. **Behav. Brain Res.**, v. 114, n. 1/2, p. 175-181.
- DESS, N.K.; MINOR, T.R.; BREWER, J. (1989). Suppression of feeding and body weight by inescapable shock: Modulation by quinine adulteration, stress reinstatement, and controllability. **Physiol. Behav.**, v. 45, p. 975-983.
- FAVARATO, M. E. C. S.; ALDRIGHI, J. M. A mulher coronariopata no climatério após a menopausa: implicações na qualidade de vida. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 339-345, 2001.
- FRANZEN, R. (2012). Efeito do ciclo menstrual na produção de força: revisão de literatura, Porto Alegre-RS p. 9-19.
- FREEMAN, M.E.; DUPKE, K. C. & CROTEAU, C.M. Extinction of estrogen-induced daily signal for LH release in the rat: a role for the proestrous surge of progesterone. **Endocrinology** **99**: 223-229, 1976.
- GENAZZANI A.R., BERNARDI F., PLUCHINO N., BEGLIUMINI S., LENZI E., CASAROSA E., LUISI M. Endocrinology of menopausal transition and its brain implications. **CNS Spectrums**. 2005;10:449-457.
- GOSDEN RG, BOLAND NI, SPEARS N, MURRAY AA, CHAPAMN M, WADE JC, ZOHDY NI. The biology and technology of follicular oocyte development in vitro. **Reprod Med Rev**, v.2, p.29-152, 1993.

- GRIPPO,A.J., BELTZ,T.G., AND JOHNSON,A.K. (2003). Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. **Physiol Behav.** 78, 703-710.
- GUYTON AC, Hall JE. **Tratado de fisiologia médica.** 10ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002.
- HALL J, E. Neuroendocrine changes with reproductive aging in women. **Semi Reprod Med**;25(5):344–51, 2007.
- HOLLINSHEAD, W. H.; ROSSE, C. **Anatomia.** 4. ed. Rio de Janeiro, Interlivros, 1991.
- JUNQUEIRA, UCHOA, L.C, CARNEIRO, J.**Histologia Básica.** 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004
- KAJANTIE,E., AND PHILLIPS,D.I. (2006). The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. **Psychoneuroendocrinology** 31, 151-178
- KALANTARIDOU., S.N. KALANTARIDOU, A. MAKRIGIANNAKIS, E. ZOUMAKIS, G.P. CHROUSOS. Stress and the female reproductive system. **J. Reprod. Immunol.**, 62 (2004), pp. 61–68
- KAO,S.W., SIPES,I.G., AND HOYER,P.B. (1999). Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. **Reprod. Toxicol.** 13, 67-75.
- KAPLAN, J. R., MANUCK S.B., Ovarian dysfunction stress, and disease: a primate continuum. **ILAR Journal.** 2004; 45:89–93.
- KONDO W, Zomer MT, Pinto EP, Ribeiro R, Ribeiro MFC, Trippia CR, Trippia CH. Deep infiltrating endometriosis:

imaging features and laparoscopic correlation. **Journal of Endometriosis**. 2011;3(4):197-212.

KOTWICA J¹. Role of the noradrenergic system in the secretory function of the corpus luteum. **J Physiol Pharmacol**. 1992 Dec;43(4 Suppl 1):131-42.

LOHFF JC, CHRISTIAN PJ, MARION SL, ARRANDALE A, HOYER PB. Characterization of cyclicity and hormonal profile with impending ovarian failure in a novel chemical-induced mouse model of perimenopause. **Comp Med**. 2005

LONG JA, EVANS HM. THE ESTROUS CYCLE IN THE RAT AND ITS ASSOCIATED PHENOMENA. **Memories of University of California**. 1922; 6:1–148.

LUCCI C.M., KACINSKIS M.A., RUMPF R. & BAO S.N. 2004. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**. 61:461-472.

LUNDBER, G.U. Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, p.1017-1021, 2005.

MAO J, WU G, SMITH MF, MCCAULEY TC, CANTLEY TC, PRATHER RS, DIDION BA, DAY BN. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. **Biol Reprod**, v.67, p.1197-1203, 2002.

MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**. 2002; 62:609–614.

MAYER, L.P., DEVINE, P.J., DYER, C.A., AND HOYER, P.B. (2004). The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biol. Reprod.** 71, 130-138.

MAYER LP¹, PEARSALL N. A., CHRISTIAN P. J., DEVINE P. J., PAYNE C. M., MCCUSKEY M. K., MARION S. L., SIPES I. G., HOYER P. B. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. **Reprod Toxicol.** 2002 Nov-Dec;16(6):775-81.

M.E. BLEIL^{1,*}, N.E. ADLER¹, L.A. PASCH¹, B. STERNFELD², S.E. GREGORICH³, M.P. ROSEN⁴, AND M.I. CEDARS⁴. Psychological stress and reproductive aging among pre-menopausal women. Advanced Access publication on July 5, 2012 doi:10.1093/humrep/des214. **Human Reproduction**, Vol.27, No.9 pp. 2720–2728, 2012.

MOORE KL, PERSAUD TVM. **Embriologia Clinica**. 6ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2000.

MOREIRA, S.N.T; MELO, C.O.M.; TOMAZ, G.; AZEVEDO, G.D. Estresse e ansiedade em mulheres inférteis. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 2006; 28(6): 358-64.

OLDHAM, C.M.; PEARCE, D.T.; GRAY, S.J. Progesterone priming and age of ewe affect the life- span of corpora lutea induced in the seasonally anovulatory Merino ewe by the “ram effect”. **J Reprod. Fertil.**, v.75, p.29-33, 1985.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Investigaciones sobre la menopausia em los años noventa*. Ginebra, 1996.

OTTENWELLER, J.E.; SERVATIUS, R.J.; TAPP, W.N.; DRASTAL, S.D.; BERGEN, M.T.; NATELSON, B.H. (1992). A chronic stress state in rats: Effects of repeated

stress on basal corticosterone and behavior. **Physiol. Behav.**, v. 51, p. 689-698.

PARKENING TA, COLLINS TJ, SMITH ER. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. **Neurobiol Aging**. 1982; 3:31-5.

PHILOCREON GR. Ovários e tubas uterinas: In Petroianu A. **Anatomia cirúrgica**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1999. pp 581-590.

POTTER, A. W., CHANDRASEKHAR, C. A., US and CT evaluation of gynecologic origin in nonpregnant premenopausal patients. **Radiographics**. 2008; 28 (6): 1645-59.

REIS, F. M.; PESTANA-OLIVEIRA, N.; LEITE, C. M.; LIMA, F. B.; BRANDÃO, M. L.; GRAEFF, F. G.; DEL-BEM, C. M.; ANSELMO-FRANCI, J. A. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, 2014, 49:130-40

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. (1993). Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiol. Behav.**, v. 53, p. 383-388.

SCALZILLI, B; PEREIRA, J. & MORAES, I.A. disponível em: <<http://www.uff.br/webvideoquest/MN/LM18.htm>>
Visualizado 17/10/2016 às 15:16 horas.

SMITH, M.S.; FREEMAN, M.E & NEILL, J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology** 96: 219-226, 1975.

- SNELL RS. **Anatomia clínica para estudantes de medicina**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.
- SPRINGER, L. N. et al. Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide- induced ovotoxicity in rats. **Reprod. Toxicol.** v 10. pg .137-143,1996.
- STEENBERGEN, H.L.; FARABOLLINI, F.; HEINSBROEK, R.P.W.; VAN DE POLL, N.E. (1991) Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Behav. Brain Res.*, v. 43, p. 159-165.
- THURSTON,R.C., AND KUBZANSKY,L.D. (2007). Multiple sources of psychosocial disadvantage and risk of coronary heart disease. **Psychosom. Med.** 69, 748-755.
- ULRICH-LAI Y. M. AND HERMAN J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci.** Jun;10(6):397-409.
- URDAMPILLETA, L; FERNANDEZ D. Psicologia da anovulação. In: Busso NE, Acosta AA, Remohi J. Indução da ovulação. São Paulo: Atheneu; 1999.
- VAN DE GRAAFF KM. **Anatomia humana**. 6ed. São Paulo. Manole. 2003
- WALMER DK, WRONA MA, HUGHES CL, NELSON KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. **Endocrinol.** 1992; 131:1458–1466.
- WHIRLEDGE S, CIDLOWSKI JA. Glucocorticoids, stress, and fertility. **Minerva endocrinologica.** 2010; 35(2):109-125.

- WILLNER,P., TOWELL,A., SAMPSON,D., SOPHOKLEOUS,S., AND MUSCAT,R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology** (Berl) 93, 358-364.
- WOODMANSEE, W.W.; SILBERT, L.H.; MAIER, S.F. (1993). Factors that modulate inescapable shock-induced reductions in daily activity in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 45, p. 553-559.
- YOUNG B, HEATH JW. WHEATER **histologia funcional: texto e atlas em cores**. 4ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001.
- ZHANG,W.Y., LIU,S., LI,H.D., AND CAI,H.L. (2012). Chronic unpredictable mild stress affects myocardial metabolic profiling of SD rats. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 70, 534-538.
- ZHENG, C.; ZHANG, T. Alteration of phase-phase coupling between theta and gamma rhythms in a depression-model of rats. **Cogn Neurodyn**, v.7, n.2, p.167-172, 2013.